

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação do potencial citotóxico dos compostos organoselenados, HSe-01 e HSe-02

Caroline Leal Rodrigues Soares

João Pessoa – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação do potencial citotóxico dos compostos organoselenados, HSe-01 e HSe-02

Caroline Leal Rodrigues Soares

Orientador

Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo

Co-orientador

Dr. Gláucia Veríssimo Faheina Martins

Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico
de conclusão de Curso), como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

João Pessoa – 2016

Catálogo na publicação

Universidade Federal da Paraíba

Biblioteca Setorial do CCEN

Bibliotecária Josélia M. O. Silva – CRB15/113

S676a	<p>Soares, Caroline Leal Rodrigues. Avaliação do potencial citotóxico dos compostos organoselenados, HSe-01 e HSe-02 / Caroline Leal Rodrigues Soares. – João Pessoa, PB, 2016. 71p. : il. color.</p> <p>Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba. Orientador: Prof. Dr. Demétrius Antônio Machado de Araújo.</p> <p>1. Câncer. 2. Tumores. 3. Organoselenados. 4. Apoptose. I. Título.</p>
BS-CCEN	CDU 616-006(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caroline Leal Rodrigues Soares

Avaliação do potencial citotóxico dos compostos organoselenados, HSe-01 e HSe-02

Trabalho – Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Demétrius Antônio Machado de Araújo

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Tatjana Keesen de Souza Lima

Gláucia Veríssimo Faheina Martins (Suplente)

Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por ter me colocado em um curso que a princípio não combinava comigo e ter me feito entender o motivo de estar lá. Agradeço por ter me dado o privilégio de estudar um pouco de cada parte da sua criação, do micro ao macro, e por ter me feito entender, através da ciência, que Ele está presente em absolutamente tudo.

Aos meus pais Cristiane Leal e César Soares, meus irmãos César e Clarisse, e toda a minha família pelo apoio em todos os momentos ao longo da minha formação acadêmica, por ter me aguentado nos momentos de estresse, que foram muitos, e me dado o maior apoio em todas as minhas escolhas.

Ao meu orientador prof. Dr. Demétrius por ter me recebido no laboratório com braços abertos, com paciência e sempre sorriso no rosto e ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar nessa área apaixonante que é a biotecnologia celular e molecular.

A minha co-orientadora e “mãe científica” Glaucia Faheina, por ter me acolhido como sua orientanda e, como ela mesma fala, ter me adotado como filha científica. Agradeço, por toda atenção, todos os ensinamentos e todo o cuidado que teve comigo ao longo desses 3 anos e meio. Sou extremamente grata pelas conversas, pelos conselhos e até pelas reclamações, que foram extremamente importantes para o meu crescimento como pessoa e pesquisadora!

A todos os atuais e antigos participantes do laboratório de biotecnologia celular e molecular, por a cada dia tornar o ambiente de trabalho o mais agradável possível! Por todo o companheirismo, pelas descontrações, pelas conversas, por todo o apoio! Em especial, agradeço a Bruna Dantas, por ter me ensinado e participado de vários resultados importantes desse trabalho!

Ao melhor companheiro de laboratório e da vida que pude ter, Caio Lucena. Sou grata por toda a paciência nos momentos difíceis, por todo o apoio, cuidado, amor e todas as palavras de encorajamento, “tudo sempre vai dar certo!”. Também agradeço pelas contribuições extremamente importantes para a realização desse trabalho.

A todos os meus colegas de curso: Fabrício, Manoel, Karina, Augusta e Laergia por todo o companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos, mesmo muitas vezes distante sempre estiveram me ajudando, cada um do seu jeito! Em especial, agradeço a Mayara Moraes (Maara) pela parceria, companheirismo e amizade, principalmente, quando a turma inteira foi embora e só ficou nós duas (e que bom que ficou nós duas!)

As minhas amigas que carrego no coração por toda a minha vida! Ingrid, Lays, Fany, Bianca, Polly e Stéphanie! Agradeço pela paciência, pela compreensão por estar em muitos momentos ausente, e agradeço sobretudo pelo apoio que sempre me foi dado!

A todos os meus professores de graduação do Departamento de Biologia Molecular e do Departamento de Sistemática e Ecologia. Pelos ensinamentos transmitidos e pelos exemplos de professores e biólogos que tive ao longo desses 4 anos.

As professoras Dr^a. Tatjana Keesen e Dr^a. Adna Sousa, por ter aceitado avaliar o meu trabalho, exemplos de pesquisadores que tenho certeza que contribuíram para o meu crescimento científico.

Ao CNPQ , Departamento de Biotecnologia e UFPB pela estrutura e apoio financeiro para realização desse trabalho

Muito obrigada!!!

Todos vocês são extremamente especiais para mim!

Caroline Soares

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo. O seu tratamento, requer o uso de terapias física e medicamentosa, que apesar de efetivas na remoção e ataque as células cancerígenas, principalmente no início da doença, não são seletivas. A busca por novos compostos seletivos e atuantes como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer vem se intensificando. Compostos selenados são uma classe de moléculas sintéticas que têm apresentado várias atividades biológicas, tais como: atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica e anticâncer. Além disso, estudos relatam que esses compostos apresentam inibição do crescimento de vários tipos de tumores sólidos, incluindo, pulmão e hepático, e em diversos tipos de leucemias, como leucemia linfoblástica e mielobástica. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica dos compostos organoselenados, HSe-01 e HSe-02 frente a células normais e linhagens de células cancerígenas, identificando o tipo de morte celular induzida por estas moléculas. A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de formação do composto formazam e de exclusão do azul de tripan. Os compostos HSe-01 e HSe-02 demonstraram efeito citotóxico em linhagens de células cancerígenas humanas (HL-60, K562, K562-Lucena, Thp-1) e um efeito citotóxico menos expressivo em células não cancerígenas (HUVEC), a partir da concentração de 6,25 μ M. Diante do potente efeito citotóxico e da seletividade dos compostos no período de 24h frente a linhagem celular K562, avaliou-se os mecanismos de morte celular nessa linhagem. Os compostos organoselenados apresentaram redução da viabilidade celular nas células K562 com CI_{50} de 40 μ M \pm 0,35 e 42,5 μ M \pm 0,37, para os compostos HSe-01 e HSe-02, respectivamente. No teste de exclusão, no período de 24h, os compostos não reduziram a viabilidade nas células K562. A capacidade destes compostos provocarem alterações moleculares associadas ao tipo de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Após um período de 24h, os compostos organoselenados não ocasionaram dano à membrana celular. Na concentração 40 μ M, os compostos HSe-01 e HSe-02, nessa ordem, induziram aumento da concentração de DNA subdiploide de 9,1 \pm 1.9% no controle para 15,6 \pm 1.3% e 15,9 \pm 1.3%, parou o ciclo celular na fase G1 de 38,6 \pm 3,2% no controle para 51,8 \pm 3% e 45,4 \pm 4%, além de induzir despolarização na membrana mitocondrial de 12,4 \pm 4.1% do controle para 28,8 \pm 6,2% e 31,1 \pm 6,8%. Logo, os compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 demonstram um potente potencial *in vitro* para linhagens leucêmicas, notadamente nas células K562, por atuarem, possivelmente, pela via intrínseca da apoptose, comportando-se como potenciais drogas candidatas para o estudo de novas moléculas contra o câncer.

Palavras- chave: câncer, organoselenados, apoptose.

ABSTRACT

Cancer is the second major cause of death in the world and its treatment still requiring the use of therapeutic modalities, physical or drug, although majority of them is effective in terms of removal and attack of cancer cells, especially early in the disease. However, those treatments haven't been perfectly selective. Consequently, the study of new selective target compounds with therapeutic potential against cancer has been intensified. Selenides compounds are one class of molecules which has shown many biological activities such as antibacterial, antiviral, antifungal and anticancer. In addition, the organoselenium compounds have shown an effect in many kinds of solid tumors including lung and hepatic tumors and also are showed action in lymphoblastic and myeloblastic leukemia. The aim of this study was to analyze the cytotoxic activity of HSe-01 and Hse-02 organoselenium compounds compared to non-cancer and Cell Cancer cells, identifying the type of cell death induced by these molecules. Cell viability was determined by MTT reduction and trypan blue exclusion. The Hse-01 and Hse-02 compounds demonstrated potent cytotoxic effect on human cancer lines (HL-60, K562, K562-Lucena, and Thp-1) and a less expressive cytotoxic effect on non-cancerous cells (HUVEC), from a concentration of 6.25 μ M. Due to potent and selectivity cytotoxic effect of the compounds in 24-hour in K562 cells line, it was evaluated the mechanisms of cell death in these cells. The organoselenium compounds showed cell viability reduction in K562 cells with IC_{50} of 40 μ M \pm 0.35% and 42.5 μ M \pm 0.37% for HSe-01 and HSe-02 compounds, respectively. In exclusion test after 24h and incubated at lower concentration (25 μ M), the compounds did not reduce the viability in K562 cells. The ability of these compounds to cause molecular changes associated with the type of cell death was evaluated by flow cytometry. After a period of 24h, those compounds did not cause damage to the cell membrane. In concentration of 40 μ M, the compound HSe -01 and HSe -02, induced an increase of subdiploid DNA concentration from 9.1 \pm 1.9% to 15.6 \pm 1.3% and 15.9 \pm 1.3%, respectively and arrested in the G1 phase of the cell cycle from 38.6 \pm 3.2% to 51.8 \pm 3% and 45.4 \pm 4%, respectively and those compounds induced depolarization of mitochondrial membrane from 12.4 \pm 4.1% to 28.8 \pm 6.2% and 31.1 \pm 6.8% for HSe-01 and HSe-02, respectively. It was concluded that the HSe-01 and HSe-02 organoselenium compounds showed a potent cytotoxic potential for leukemic cell lines, notably K562 cells, by act possibly by intrinsic apoptosis behaving as potential drug candidates for the study of new molecules against cancer.

Keywords: cancer, organoselenium, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características essenciais para a progressão do câncer	19
Figura 2: Incidência dos dez tipos de câncer que mais afetam a população brasileira em homens (à esquerda) e em mulheres (à direita), exceto o câncer de pele não melanoma	20
Figura 3: As duas principais vias apoptóticas: via extrínseca e via intrínseca	28
Figura 4: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre a linhagem K562-Lucena após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.	43
Figura 5: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre a linhagem K562-Lucena após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.	44
Figura 6: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre linhagem Thp-1 após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.	44

Figura 7: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre linhagem Thp-1 após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle. 45

Figura 8: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre as linhagens K562 Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 24 horas (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle 46

Figura 9: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 24 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle. 47

Figura 10: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle. 48

Figura 11: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 24 horas (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Figura 12: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células K562 após o tratamento de 24h com os compostos HSe-01 (A) e HSe-02 (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. Ctl: controle.

Figura 13: Efeito do composto HSe-01 sobre a distribuição do DNA nas fases do ciclo celular após 24h de tratamento. Os histogramas representam o controle (A) e a exposição das células ao HSe-01 na concentração de 40 μ M (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: controle.

Figura 14: Efeito do composto HSe-02 sobre a distribuição do DNA nas fases do ciclo celular após 24h de tratamento. Os histogramas representam o controle (A) e a exposição das células ao HSe-02 na concentração de 40 μ M (B). 53

Figura 15: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo nas células K562 após o tratamento de 24h com os compostos HSe-01 (A) e HSe-02 (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: controle. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens tumorais e não tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
Tabela 2: Valores da IC ₅₀ obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células HL-60, K562 e PBMC com os organoselenados HSe-01 e HSe-02, por 24 e 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear	42
Tabela 3: Efeito do composto HSe-01 na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular nas células K562	51
Tabela 4: Efeito do composto HSe-01 na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular nas células K562	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator 1 de ativação apoptótica
Bak	<i>Bcl-2 antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>Bcl-2 interacting domain death agonist</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CI50	Concentração inibitória média capaz de promover 50% do efeito máximo
Etop.	Etoposídeo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídeo
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBMC	Células mononucleares do sangue humano periférico
PBS	Solução salina tamponada com sais de fosfato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Smac/ Diablo	Proteína mitocondrial pró apoptótica
TRAIL	ligante indutor de apoptose

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	Câncer	18
1.2.	Selênio	21
1.2.1.	Organoselenados	22
1.3.	Citotoxicidade	23
1.4.	Morte celular	24
1.4.1.	Apoptose	26
1.4.2.	Regulação do ciclo celular e gene p53	29
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	Geral	32
2.2.	Específicos	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1.	Materiais	34
3.1.1.	Equipamentos	34
3.1.2.	Reagentes e soluções	34
3.1.3.	Organoselenados	35
3.1.4.	Linhagens celulares	35
3.2.	Métodos	37

3.2.1. `Técnica de MTT	37
3.2.2. Teste de exclusão do azul de tripan	38
3.2.3. Ensaio da integridade da membrana celular por citometria de fluxo	39
3.2.4. Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular	39
3.2.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	40
3.2.6. Análise dos dados de citometria de fluxo	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Efeito citotóxico dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02	42
4.2. Avaliação do tipo de morte celular	49
4.2.1. Efeitos dos compostos organoselenados na integridade da membrana plasmática	50
4.2.2. Efeito dos compostos organoselenados na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular	51
4.2.3. Efeito dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS	65

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O processo de carcinogênese ou progressão tumoral comumente ocorre de forma lenta, podendo levar anos até a formação de um tumor visível ou de um acúmulo de células progenitoras anormais não diferenciadas, sendo reflexo da ação da evolução por mutação e seleção natural entre células somáticas (ALBERTS et al, 2004; FAHEINA-MARTINS, 2009).

O câncer é uma doença genética que altera a expressão e funcionamento de proto-oncogenes no processo de homeostasia celular. Dessa forma, essa doença surge como consequência do acúmulo de mutações na expressão de proto-oncogenes ou de gene supressor de tumor. Este fenômeno pode acontecer devido a agentes genotóxico, causando mutação ou anormalidades cromossômicas, ou por meio de mudanças epigenéticas, como metilação do DNA e remodelação da cromatina por proteínas histonas (DANTAS, 2014; JAFARNEJAD et al, 2011).

O produto dessas alterações genéticas pode levar ao mau funcionamento da regulação do ciclo celular, no qual, células mutadas e lesionadas, que deveriam ser mortas no processo de regulação, seja por via de sinalização intrínseca (de origem mitocondrial) ou extrínseca (de origem na membrana celular), progridam no ciclo celular e, conseqüentemente, acumulem mutações no organismo. Com essas alterações, as células cancerígenas adquirem algumas características (Figura 1), tais como: potencial de proliferação ilimitado, capacidade de invadir tecidos e causar metástase e resistência a processos de morte celular, dentre outras (FOSTER, 2008; HANAHAN, 2011).



Figura 1: Características essenciais para a progressão do câncer (Adaptado de HANAHAN, 2011)



O câncer é a segunda causa de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares e suas taxas de incidência e mortalidade estão em constante aumento. Segundo Murthy et al (2011), as causas do agravamento dos índices do câncer estão relacionados ao envelhecimento e crescimento populacional, maus hábitos alimentares e estilo de vida não saudável.

O câncer pode ser causado por diversos fatores, sendo eles internos ou externos ao organismo. Entre os fatores externos, estão o meio ambiente, como altos índices de radiações ultra-violetas na superfície terrestre, má nutrição, uso de tabaco, drogas ilícitas, álcool e sedentarismo, os quais são responsáveis por mais de 80% dos casos de morte por câncer. Além disso, estudos mostraram correlações estatisticamente positivas entre a mortalidade por câncer e a percentagem da população ativa em indústrias de metal, madeira e móveis. (KYE et al, 2015; CORELLA et al, 2000). Os fatores internos são, em sua maioria, geneticamente pré-determinados, e podem estar associadas a capacidade do organismo de se defender a agressões externas (DANTAS, 2014; WEINBERG, 2008).

Segundo o Instituto Nacional de câncer (INCA), com bases em dados fornecidos pela World cancer report 2014 da International Agency for Research on Cancer (Iarc), da

Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. Além disso, a estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc, apontou que, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento, com 70% de óbitos (INCA, 2015).

Para o Brasil, a estimativa para os anos de 2016 e 2017 aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Dentre esses, os mais incidentes serão os cânceres de próstata, traqueia, brônquio e pulmão, para o sexo masculino, e mama, cólon e reto, para o sexo feminino (Figura 2) (INCA, 2015).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2: Incidência dos dez tipos de câncer que mais afetam a população brasileira em homens (à esquerda) e em mulheres (à direita), exceto o câncer de pele não melanoma (Fonte: INCA, 2015)

O tratamento medicamentoso do câncer atualmente ainda requer uso de modalidades terapêuticas que apesar de serem efetivas, em grande parte, na remoção e ataque as células cancerígenas, não são seletivas, isto é, afetam células saudáveis, ocasionando uma série de danos ao organismo, seja de maneira aguda ou crônica devido aos seus intensos efeitos tóxicos (FREITAS, 2010).

Diante disso, a busca por novos compostos que sejam seletivos e atuem como alvos terapêuticos para o tratamento do câncer vem se intensificando, com destaque a pesquisa de

novas moléculas bioativas, naturais ou sintéticos, que tem demonstrado atividade específica para células tumorais. (REDDY, 2003).

1.2. Selênio

O selênio (Se) é caracterizado como um uma substância natural, sólida, amplamente distribuída na crosta da Terra, mas de forma desigual. O selênio não é frequentemente encontrado no ambiente em sua forma elementar, mas é geralmente combinado com outros compostos, podendo ser encontrado, por exemplo, combinado com cobre ou níquel. Além disso, o selênio é encontrado na água, devido ao intemperismo das rochas e dos solos, em plantas e animais, pela absorção da água e/ou cadeia alimentar; também está presente no ar, combinado com o oxigênio e em combustíveis fosseis (RISHER et al, 2003).

Estudos indicam que o selênio é um elemento essencial para os seres humanos, sendo incorporado a aminaácidos denominados selenocisteínas, formando as selenoproteínas, que possuem diversas funções no organismo, tais como, controle do estresse oxidativo e de respostas inflamatórias. A deficiência em selênio têm sido associada a diversos distúrbios no organismo, dentre eles, a doença de Keshan, diabetes e câncer (PRABHU et al, 2016; RAYMAN, 2012; BELLINGER et al, 2010).

Compostos selenados têm atraído interesse como agentes quimiopreventivos para o câncer humano. Segundo PraBhu et al (2016), altas concentrações de selênio no organismo, de modo que ocorra uma saturação de selenoproteínas, estão associados a diminuição da incidência do câncer. Além disso, dados na literatura comprova atividade citotóxica de compostos selenados em diversos tipos de tumores, dentre eles, câncer de mama, cólon, pulmão e sarcoma (SANMARTIN et al, 2008).

Estudos demonstraram, consistentemente, que as formas de dosagem e química do selênio são fatores determinantes na atividade anticâncer, com compostos orgânicos sendo mais biodisponíveis do que as formas inorgânicas. O metabolismo destes compostos organoselenados é essencial para a atividade destes, sendo os principais metabólitos ativos seleneto de hidrogênio e o metilselenol, que induzem tipos distintos de efeitos

anticancerígenos com mecanismos anti-angiogênese, indutores de apoptose e efeitos no ciclo celular (SANMARTÍN et al, 2009; LUCENA, 2014).

1.2.1. Organoselenados

Atualmente, a busca por compostos sintéticos organoselenados está se tornando cada vez mais intenso, devido as suas interessantes propriedades farmacológicas, especialmente atividade antitumoral. Estudos experimentais, utilizando diversos modelos de câncer, têm demonstrado que alguns organoselenados possuem atividade anticarcinogênica, atuando em diferentes níveis celulares e moleculares (KIM et al, 2015).

Várias vias foram consideradas na quimioprevenção do câncer mediado por compostos organoselenados: proteção da função das selenoproteínas, efeitos do sistema imune, desintoxicação de metais antagonistas, inativação de fatores de transcrição, regulação das lipoxigenases, redução do estresse oxidativo. No entanto, o fenômeno mais significativo na quimioterapia do câncer pelos compostos organoselenados, é por meio da indução da morte celular via apoptose (RIZVI et al, 2014).

Segundo Suzuki et al (2010), os compostos organoselenados apresentaram atividade antitumoral em câncer de pulmão e de pele por meio da indução de morte celular por apoptose mediado pela ativação de caspases, associado com a diminuição da fosforilação de AKT/PKB e ERK1/2, e ativação do gene supressor tumoral, P53. Além disso, alguns compostos organoselenados podem ativar a via apoptótica a partir da superexpressão da proteína Bax, parada no ciclo celular e dano ao DNA em cânceres de pulmão, colorretal e próstata.(SHI et al, 2003; YIN et al, 2012; BATTIN, 2011).

Compostos organoselenados, já descritos na literatura, apresentaram inibição do crescimento de vários tipos de tumores sólidos, incluindo, pulmão e hepático. Além disso os compostos organoselenados também apresentaram-se efetivos contra diversos tipos de leucemia, tanto leucemia linfoblástica como mielobástica (LUCENA, 2014; SHI et al, 2003; ZHAO, 2013).

Dessa forma, a síntese e o estudo biológico, em nível celular e molecular, de novos compostos organoselenados tornam-se bastante promissores na busca de novas moléculas com potente atividade anticâncer.

1.3. Citotoxicidade

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo*, utilizando diversas espécies de animais. Essas técnicas de bioensaios avaliam e definem a concentração de uma substância capaz de produzir uma resposta biológica em nível celular ou sistêmico (RANG et al, 2004).

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não causem reações adversas e nem lesem o organismo do paciente (ROGERO et al, 2003).

A citotoxicidade considera, primariamente, o potencial de um composto induzir morte celular. Testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto em causar morte celular, como consequência de danos às funções básicas celulares (EISENBRAND, 2002).

Os sistemas celulares mais empregados na toxicologia *in vitro* incluem: culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células troncos, células em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas de diferentes tipos celulares, culturas tridimensionais, amostras de tecidos e sistemas de barreira (ZUCCO et al, 2004; FREITAS, 2010). Os testes em células tumorais, por exemplo, têm sido amplamente utilizados para obter dados preliminares da potencialidade de agentes anticancerígenos contra várias células tumorais e estabelecer o perfil de ligação de diversas moléculas a receptores (SNODIN, 2002).

Vários parâmetros que avaliam diferentes alvos estão envolvidos em ensaios de citotoxicidade. Os mais frequentes utilizados são: inibição da proliferação celular, dano na

membrana celular, danos a organelas, alterações morfológicas e redução da função metabólica (DANTAS, 2014; EISENBRAND, 2002).

Dessa forma, ensaios citotóxicos com diferentes culturas podem ser utilizados com sucesso e possuem diversas vantagens: são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*, além de reduzir o número de animais utilizados, posteriormente, em testes *in vivo* (ROGERO, 2003). Além disso, esses estudos ainda permitem a avaliação e cálculo da CI_{50} , que corresponde a concentração do composto capaz de obter 50% do seu efeito máximo.

Os efeitos tóxicos nem sempre resultam em morte celular, ao menos não imediatamente, e as células podem sofrer alterações metabólicas, ou alterações no ciclo celular sem nenhuma diminuição da viabilidade celular aparente. Este tipo de resposta é denominado citostática e usualmente reversível, resultando da privação de nutrientes ou fator de crescimento, ou presença de um regulador negativo de crescimento. Mas pode ser também irreversível, por exemplo, quando as células entram em apoptose (FRESHNEY, 2001).

1.4. Morte Celular

As células dos organismos multicelulares são membros de uma comunidade altamente organizada. O número de células na comunidade é regulado, não apenas pelo controle da taxa de divisão celular, mas também pelo controle da taxa de morte celular. Sabe-se que o desenvolvimento e a manutenção dos organismos dependem da interação entre células que o constituem. A morte celular é um processo fundamental durante esses processos fisiológicos. Ela acontece naturalmente durante o desenvolvimento e o envelhecimento, além de também atuar como um mecanismo homeostático para manter a população celular nos tecidos (ZIEGLER et al, 2004; COULIDIATI; 2014).

A morte celular pode ser classificada de acordo com suas características morfológicas, critérios enzimáticos, aspectos funcionais e/ou imunológicos. A *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) frequentemente define diferentes tipos de morte celular por critérios morfológicos, sem definição precisa dos mecanismos bioquímicos (KROEMER, 2005).

A aquisição de características de morte celular, nem sempre determinam a morte da célula. Para que as células morram é necessário transgredir um “ponto de restrição”, tornando o processo de morte irreversível. Na ausência de eventos bioquímicos claramente definidos para definir o “ponto de restrição”, o NCCD propõe que uma célula deve ser considerada morta na presença de qualquer um dos seguintes critérios moleculares ou morfológicos: a perda da integridade da membrana plasmática, a fragmentação da célula, incluindo o seu núcleo, em corpos discretos (frequentemente definidos como “corpos apoptóticos”), e/ou quando os fragmentos celulares ou corpos apoptóticos são englobados por células adjacentes *in vivo* (KROEMER et al, 2009; DANTAS, 2014).

Dentre os principais tipos de morte celular descritos atualmente, a necrose vem ganhando destaque em diversos casos patológicos. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. É considerada uma resposta passiva à injúria celular, entretanto estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (GRIVICICH et al, 2007).

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (GRIVICICH et al, 2007).

A evasão da morte celular é uma das características principais das células cancerígenas. Diante disso, a indução da morte celular por meios farmacológicos é o principal fundamento das terapias não invasivas contra o câncer, destacando-se a indução da morte celular por apoptose, tanto pela via intrínseca, quanto pela via extrínseca.

1.4.1. Apoptose

A apoptose, é um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas (por exemplo, nos processos embrionários) e patológicas (como a morte celular induzida por células do sistema imune), constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e, de renovação celular e tecidual. A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas celulares, incluindo a formação de vacúolos citoplasmáticos pela formação de protuberâncias (blebs) da membrana celular, as quais aumentam e se rompem originando os corpos apoptóticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação da cromatina, despolarização da membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídios da membrana plasmática, como a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana. Como resultado de todas essas alterações, as células apoptóticas são fagocitadas antes do extravasamento do conteúdo intracelular e sem induzir uma resposta inflamatória (ANAZETTI et al, 2007).

A maioria das mudanças morfológicas que ocorrem na morte celular por apoptose são mediadas por um conjunto de proteases de cisteína que são ativadas especificamente em células apoptóticas, nas quais reconhecem e clivam substratos que possuam resíduos de aspartato. Essas proteases são homólogas entre si e fazem parte de uma família de proteases conhecidas como caspases. (HENGARTNER, 2000; GRIVICICH et al, 2007).

As caspases são sintetizadas como zimogênios, ou pró-enzimas inativas, e são ativadas por outras pró-caspases: encontradas solúveis no citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células. Esta cascata proteolítica na qual uma caspase pode ativar outra caspase amplifica a via de sinalização e isto leva a rápida morte celular (ELMORE, 2007). Dez principais caspases têm sido identificadas e amplamente categorizadas em iniciadoras (caspase-2,-8,-9,-10), efetoras ou executoras (caspase-3,-6,-7) e caspases inflamatórias (caspase-1,-4,-5) (COHEN, 1997; RAI et al.,2005).

Existem duas grandes vias de sinalização de apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. Embora, ambas possuam características morfológicas semelhantes, elas podem ser desencadeadas por diferentes vias de sinalização (Figura 3).

A indução da via extrínseca, também conhecida como via receptor de morte, ocorre após a ligação de um ligante a receptores de morte na superfície da membrana celular. Esses receptores de morte podem ser: receptor-1 de fator de necrose tumoral (TNF), receptores 1 e 2 do ligante indutor de apoptose TRAIL, CD95/ Fas. Após a ligação dos receptores de morte e sua ativação, ocorre um recrutamento e oligomerização de moléculas adaptadoras, tais como: domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD) e domínio de morte associado à proteína Fas (FADD). Esse complexo proteico, recruta e ativa por clivagem nos resíduos de aspartato procaspases iniciadoras, como as procaspase- 8. A caspase 8, já na sua forma ativa, inicia uma série de clivagens em cascata de caspases efetoras, especialmente a clivagem da procaspase-3. A caspase-3, por sua vez, cliva um grande número de substratos intracelulares, resultando nas alterações morfológicas características da apoptose (MOFFITT et al, 2010; GALLUZZI, 2014).

A caspase 8 ativada pode ativar diretamente a procaspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, um membro da família Bcl-2, para formar Bid truncado ou tBid a qual subsequentemente se localiza na mitocôndria aonde promove oligomerização de outros membros da família Bcl-2, que são proteínas que regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial, como Bax, o qual resulta na liberação de citocromo *c* e da proteína Smac/DIABLO, da mitocôndria (VERHAGEN et al, 2000; ZIMMERNANN et al, 2001).

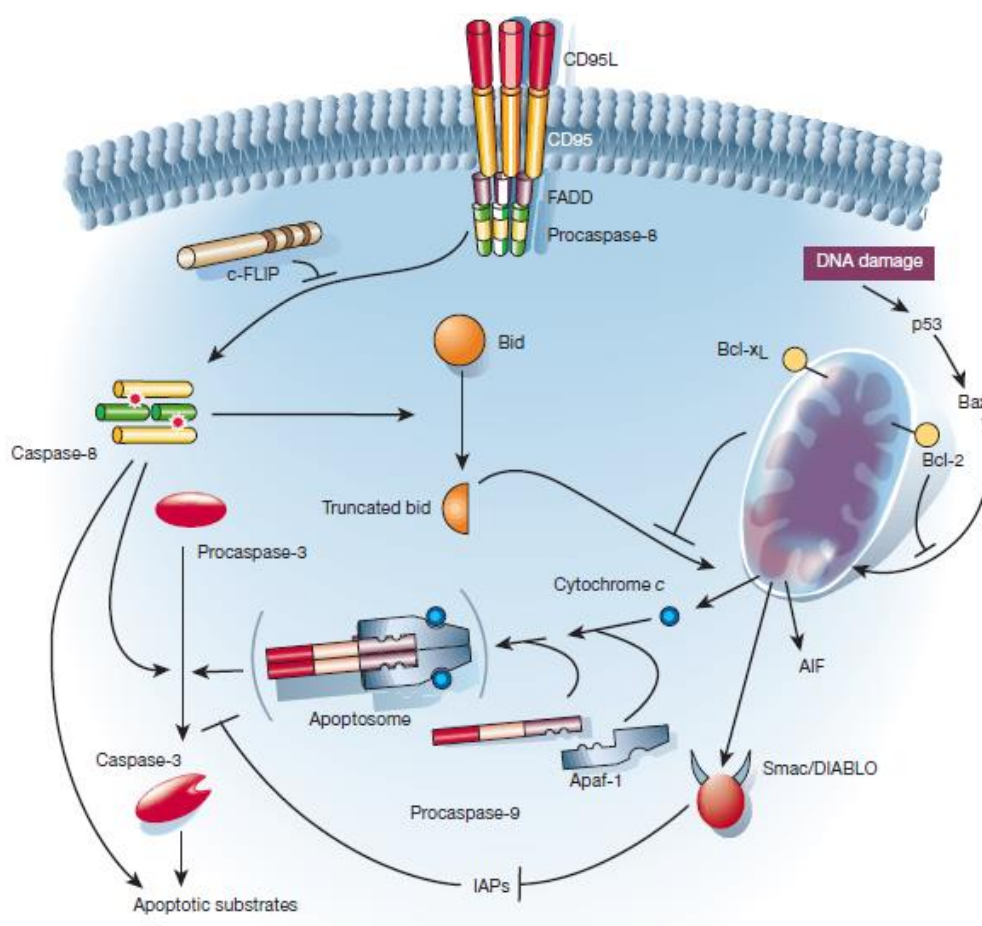


Figura 3: As duas principais vias apoptóticas: via extrínseca e via intrínseca (Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000).

A via intrínseca da apoptose, também conhecida como a via mitocondrial, inicia-se após estímulos de sinais intracelulares e extracelulares, como luz ultravioleta, espécies reativas de oxigênio, ação de agentes citotóxicos e danos ao DNA, que irão convergir na mitocôndria, principal organela envolvida na transdução dos sinais de morte e execução da apoptose, controlados e regulados por membros da família de proteínas Bcl-2. As vias de sinalização ativadas por esses agentes promovem mudanças na membrana mitocondrial interna, resultando perda do potencial transmembrânico mitocondrial (despolarização da mitocôndria), abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) e liberação de várias proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana para o citosol, destacando-se o citocromo C e Smac/DIABLO. O citocromo C liga-se a poção c-terminal da proteína pró-apoptótica Apaf-1, seguido da ligação e ativação da capase-9, formando assim o

complexo apoptossomo, que por sua vez, irá clivar e ativar a caspase-3, dando início ao processo apoptótico. A Smac/ DIABLO, promove a apoptose por inibição da IAPs (proteínas inibidores de apoptose) (ZIEGLER, 2004).

Um segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas são liberadas da mitocôndria durante a apoptose quando a célula já está condicionada a morrer. A AIF (Fator indutor de apoptose) transloca-se para o núcleo e causa condensação da cromatina e fragmentação do DNA em porções de alto peso molecular (50 - 300 Kb). A endonuclease G transloca-se para o núcleo e promove a clivagem da cromatina nuclear para produzir a fragmentação do DNA em oligonucleossomos (KITAZUMI; TSUKAHARA, 2011; KROEMER et al., 2007). CAD (DNase ativada por caspase) é subsequentemente liberada da mitocôndria e translocada para o núcleo após clivagem de ICAD (inibidor de CAD) pela caspase-3 ativa, o que leva a fragmentação do DNA oligonucleossomal, sendo um processo mais avançado que aumenta a condensação da cromatina (ENARI et al, 1998; NAGATA, 2000; MARTINS, 2009).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa anticancerígena e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (KHOO et al., 2010). De fato, muitas moléculas que atuam como barreiras para a morte celular em células tumorais estão sendo identificadas e utilizadas como alvos para a descoberta de novos compostos com objetivo de restaurar as vias naturais e induzir a autodestruição das células cancerígenas (REDDY et al, 2003).

1.4.2. Regulação do ciclo celular e gene P53

O ciclo de divisões da maioria das células compreende uma sequência complexa de eventos que garantem a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma. O ciclo celular é dividido em dois estágios: mitose (M), onde ocorre a divisão celular, e intérfase, período de crescimento celular. A intérfase é composta pelas fases G1, onde a célula produz o RNA (ácido ribonucléico) e as proteínas necessárias para a síntese do DNA, S (onde ocorre a replicação do DNA) e G2 (período no qual a célula se prepara para a mitose) (HARPER et al, 2005; LACERDA, 2012).

A progressão do ciclo celular de eucariotos superiores depende de uma classe especial

de enzimas do tipo quinase/treonina, cuja subunidade catalítica é conhecida como quinase dependente de ciclina (CDK) e a subunidade regulatória é a ciclina.

As células animais possuem várias ciclinas e CDKs que se combinam e atuam em fases específicas do ciclo celular. A passagem pelo ponto de restrição em G1 é regulada principalmente por complexos de CDK4 e CDK6 e ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3). A ciclina E é mais expressa em G1 e sua ligação à CDK2 é importante para a transição G1-S e para o início da duplicação do DNA. Os complexos CDK2-ciclina A também participam da iniciação da síntese de DNA e da progressão da fase S, enquanto a transição G2-M depende de CDK1 e ciclina B (FERREIRA et al, 2010).

Danos ao DNA ou outros insultos genotóxicos que comprometam a estabilidade do genoma levam a ativação de p53, gene supressor tumoral, resultando em parada no ciclo celular e ativação de mecanismos de reparo no DNA, ou início do processo de morte celular por apoptose, caso o dano seja irreversível (YOSHIDA et al, 2010). A proteína p53 induz parada na fase G1 do ciclo celular por meio da transativação de p21, uma proteína que se liga e silencia CDK2, impedindo a formação do complexo CDK2-ciclina E, inibindo deste modo a transição G1-S (FERREIRA, 2010; LACERDA, 2012; COSTA-SOUZA, 2011).

Diante a importância no papel do ciclo celular das CDKs e do gene supressor tumoral estudos mostram que muitos tumores levam à super expressão das ciclinas ou inativação dos seus inibidores (CDKIs) e mutações no gene p53. Muitas ações da ubiquitina-ligase, por exemplo, resultam na estabilização da ciclina E, que contribui para a tumorigênese. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (SPRUCK et al, 2002; GRIVICH, 2007).

Considerando a importante função dos compostos organoselenados sintéticos com atividade anticâncer que atuem induzindo a apoptose do tumor, o presente trabalho irá investigar os mecanismos de morte celular, causados por novos compostos organoselenados sobre cultura de células normais e tumorais humanas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a citotoxicidade dos compostos Hse-01 e Hse-02 frente a células normais e linhagens de células cancerígenas e identificar o tipo de morte celular induzida por estas moléculas.

2.2. Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos Hse-01 e Hse-02 nas linhagens leucêmicas, HL-60, K562, K562-lucena e Thp-1, e na linhagem não tumoral de cordão umbilical humana, HUVEC;
- Demonstrar o efeito dos compostos na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular;
- Estimar o efeito dos compostos sobre a integridade da membrana celular;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre o potencial de membrana mitocondrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Agitador de placa Certomat MO, EUA
- Agitador Magnético TE-088 TECNAL, BRASIL
- Autoclave, PHOENIX LUFERCO, BRASIL
- Balança analítica, MODELO FA2104N, CELTAC, BRASIL
- Banho Maria, NOVA ÉTICA, BRASIL
- Centrífuga ,HERMLE Labortchnik GMBH, ALEMANHA
- Citômetro de Fluxo BD FACS CALIBUR, EUA
- Estufa de CO₂ HF 212 UV, ULTRASAFE, CHINA
- Estufa de secagem, De Leo, BRASIL
- Fluxo Laminar PLACHANE, BRASIL
- Freezer – 20°C FE26, ELETROLUX, BRASIL
- Freezer -80°C ULT390-3-D31 INDREL, EUA
- Incubadora de células modelo: HF212; ULTRAFASE, CHINA
- Leitor de Elisa ELx800, BIOTEK, ALEMANHA
- Microscópio óptico de inversão XS 201, TAIMIN, BRASIL
- pHmetro; PHS – 3B, LABEMETER, BRASIL
- Refrigerador; ELECTROLUX, BRASIL
- Ultra-purificador, Scholar- UV, ALEMANHA
- Vortex QL-90L, VERTEX, EUA

3.1.2 Reagentes e Soluções

- Álcool etílico 70%, TOSCANO
- Azul de tripan 4%, SIGMA
- Carbonil Cianeto m-clorofenilidrazona (CCCP), SIGMA
- Dimetilsufóxido (DMSO), CRISTÁLIA

- EDTA 0,5M, SIGMA
- Etoposídeo, SIGMA
- Iodeto de propídeo 50µg/ mL de PBS, SIGMA
- Meio de Cultura celular RPMI 1640, SIGMA
- MTT, AMRESCO
- Salina Tamponada com sais de Fosfato (PBS), VETEC
- SDS/HCL, 10g de SDS (AMRESCO), 100mL HCL 0,01N (FISHER)
- Solução de antibióticos Penicilina e Estreptomicina, SIGMA
- Solução de Tripsina/EDTA, AMRESCO
- Soro Bovino Fetal Inativado (SBF), CRIPION
- Tampão de lise para análise do ciclo celular, 0,1g de citrato de sódio (GRUPO QUÍMICA), 0,1mL de Triton-X (ISO FAR), 0,2mg de IP (SIGMA)
- Tetrametilrodamina, INVITROGEN
- Vincristina, SIGMA

3.1.3 Organoselenados

Foram utilizados dois compostos sintéticos derivados do selênio, denominados de HSe-01 e Hse-02. Esses compostos foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, do Departamento de Química da UFPB. Os organoselenados foram diluídos em DMSO puro para a preparação de soluções estoques a 20 mM. As concentração final de DMSO nas culturas tratadas com os compostos, não excedeu 0,5%.

3.1.4 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de células tumorais e não tumorais, listadas na tabela 1, obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm² volume de 50 mL) utilizando meio RPMI 1640 acrescido de antibióticos: penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). As células foram manipuladas esterilmente sob fluxo laminar, a fim de evitar contaminações, e em seguida incubadas com 5% de CO₂ a 37° C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24h sob microscopia óptica de inversão e a manutenção do meio de

cultura foi realizado a cada 48h. No caso da linhagem aderente, ao atingir 80% da confluência era feito a tripsinização, retirando o sobrenadante presente no frasco e adicionando 1,5 mL de solução de tripsinização por 5 min, ou até observar o deslocamento da monocamada de células da parede do frasco. Após o deslocamento, era acrescentado 5 mL de Meio RPMI com 10% de SBF para interromper a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 500 x g/5min e ressuspensas em 3 mL de meio com SBF para a contagem na câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular. Se a cultura apresentasse 90% de células viáveis eram encaminhadas aos experimentos, e uma alíquota era adicionada em novos frascos para o cultivo. As células em suspensão eram centrifugadas diretamente, seguido da análise da viabilidade celular.

Os estoques das células foram mantidos por meio do congelamento de parte da cultura. As células aderentes, passaram pelo processo de tripsinização, seguida de centrifugação a 500g/5min, as células em suspensão foram centrifugadas diretamente. Após a centrifugação, para todas as linhagens, o sobrenadante foi desprezado e o concentrado foi resuspenso em 2 mL de meio RPMI com 10% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), que desidrata as células e impede que elas sejam criofraturadas pelos cristais de gelo formados. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos criogênicos de 2 mL e levadas por meia hora a temperatura de -20°C, seguido por mais meia hora em freezer a -80°C, e estocadas em tambor de nitrogênio líquido.

Tabela 1: Linhagens tumorais e não tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagens	Tipo histológico do câncer ou linhagem normal	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
K562	Leucemia mielóide crônica	Humana
K562-Lucena	K562 com superexpressão da Glicoproteína P	Humana
Thp-1	Leucemia monocítica	Humana
HUVEC	Célula endotelial do cordão umbilical	Humana

3.2 Métodos

3.2.1 Técnica de MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) consiste em um ensaio colorimétrico que avalia a atividade citotóxica ou proliferativa de diversos compostos (KIM et al, 2009). O MTT é um sal tetrazólio, solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan, com coloração púrpura, após a clivagem do anel tetrazólio mediado por desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas. Após a solubilização dos cristais de formazan e medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro ($\lambda = 570$ nm), é possível avaliar a viabilidade celular, onde a intensidade do produto colorido formado após a solubilização do formazan será diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (FAHEINA-MARTINS, 2009).

Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de 5×10^5 células/mL em meio RPMI suplementadas com 10% de SBF. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com os compostos HSe-01 e HSe-02 nas concentrações variando de $3,12 \mu\text{M}$ a $200 \mu\text{M}$ e incubadas a 37°C com 5% de CO_2 durante 24h e 72h. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi parcialmente removido, seguido de lavagem com PBS e adição do MTT (5 mg/mL de PBS). Passando-se 4 horas, a fim de solubilizar os cristais de formazan, adicionou-se 100 μL de SDS-HCl em cada poço. Após o período de cerca de 16 horas, as placas foram lidas, a 570 nm, em um espectrofotômetro de placas do tipo leitor de ELISA.

Análise dos dados

Os compostos foram testados em triplicata com $n \geq 3$. Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade células *versus* concentração dos compostos. A partir de uma curva de regressão não-linear dos dados obtidos, foi determinado a concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}). Os dados foram analisados no GraphPad Prism, versão 5.0 e comparados por análise de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.2.2. Teste de exclusão de Azul de Tripán

O teste de exclusão do azul de tripan permite avaliar a citotoxicidade de um composto por meio da diferenciação de células viáveis e não viáveis em uma amostra. O mecanismo do azul tripan se baseia na sua capacidade de penetrar nas células que apresentam membrana celular rompida ou funcionalmente danificada, o que impossibilita a seleção realizada pela membrana, dos compostos que irão ser transportados para o meio intracelular. As células com a membrana íntegra e funcional, irão excluir o azul tripan e permanecerão translúcidas, em contraste das células inviáveis, que apresentarão uma coloração azulada, ao ser analisadas no microscópio óptico (TRAN et al, 2011).

Procedimento experimental

As células foram semeadas a uma concentração de 5×10^5 células/mL em placa de 96 poços com os compostos HSe-01 e HSe-02 por um período de 24h e 72h, com concentrações variando de 25, 50, 100 e 200 μ M. Após o período de incubação, foi retirado uma alíquota de 90 μ L da suspensão celular, seguido de adição de 10 μ L de azul de tripan (4%). As células viáveis e inviáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer (HUK, 2015).

Análise de dados

Os compostos foram testados em duplicata com $n \geq 2$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, analisados no GraphPad Prism, versão 5.0 e comparados por análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni, para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos. Foi considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

3.2.3 Ensaio da integridade da membrana celular por citometria de fluxo

Esse teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (IP) penetrar na célula inviolável cuja membrana esteja rompida ou disfuncional, se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. As células com a membrana íntegra, ou seja, as células viáveis, não permitem a entrada do corante, portanto emitirão baixa fluorescência.

Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas com os compostos HSe-01 e HSe-02 por 24h, nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M. O Etoposídeo foi utilizado como controle positivo a 5 μ M. Após a incubação, as células foram transferidas para tubo do tipo “eppendorfs” e centrifugadas a 400g por 5min, seguido de lavagem com PBS. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1000 μ L de iodeto de propídeo (2 μ g/mL) em PBS, seguido da análise no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences).

3.2.4 Análise do conteúdo de DNA e distribuição nas fases do ciclo celular

Quatro fases podem ser reconhecidas em uma população de células em proliferação: G1, S, G2 e M, cada uma apresenta uma quantidade específica de DNA, no qual caracteriza a fase do ciclo em que a célula se encontra (NUNEZ, 2001; DANTAS, 2014). A avaliação do conteúdo de DNA consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, desde que a membrana celular seja lisada previamente por um detergente, permitindo a entrada do corante até o núcleo. Após a entrada do IP, o DNA será marcado de maneira que a quantidade e, consequentemente, a intensidade de fluorescência do IP seja proporcional a quantidade de DNA, permitindo assim a identificação da quantidade de células em cada fase do ciclo celular.

Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas com os compostos HSe-01 e HSe-02 por 24h, nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M. O Etoposídeo foi utilizado como controle positivo a 5 μ M. Após a incubação,

as células foram transferidas para tubo do tipo “eppendorfs” e centrifugadas a 400g por 5min, seguido de lavagem com PBS. O precipitado resultante foi ressuspensionado em uma solução de lise contendo IP e incubado por 30 min a 4°C, em seguida, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences).

3.2.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Essa técnica se baseia na capacidade de um corante fluorescente específico, ser captado e retido pelas mitocôndrias de células viáveis. Alterações no potencial de membrana resultam em alterações na intensidade de fluorescência do corante. A tetrametilrodamina é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana celular, que é sequestrado para o interior da mitocôndria, quando esta apresenta o seu potencial transmembrânico inalterado, apresentando assim, uma alta fluorescência nas células viáveis, devido a uma grande interação com as cargas internas da mitocôndria. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da tetrametilrodamina de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência (DANTAS, 2014; FAHEINA-MARTINS, 2009).

Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas com os compostos HSe-01 e HSe-02 por 24h, nas concentrações de 10, 20 e 40µM, sendo utilizado o CCCP e o Etoposídeo a 5µM como controle positivo. Após a incubação, as células foram transferidas para tubo do tipo “eppendorfs” e centrifugadas a 400g por 5min, o sobrenadante foi então descartado e as células incubadas com tetrametilrodamina, a uma concentração de 10 µM, a 37°C por 30 min no escuro. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, e ressuspensionadas também em PBS e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences, EUA).

3.2.6 Análise dos dados de citometria de fluxo

Os dados foram obtidos de dois ensaios em duplicata para cada concentração e expressos como média \pm desvio padrão da média, em seguida comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada alguma diferença significativa quando $p < 0,05$. Para todos os experimentos, o Citômetro contava pelo menos 5.000 eventos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito citotóxico dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02

O efeito dos compostos organoselenados HSe-01 e Hse-02 foi investigado empregando diferentes tipos de células cancerígenas e não cancerígenas, utilizando o ensaio de redução do MTT, que avalia a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais e citosólicas, e pela técnica de exclusão do azul de tripan, que avalia a integridade da membrana celular.

Lucena (2014), inicialmente avaliou nas linhagens HL-60, K562 e nas células de PBMC os organoselenados no período de 24 e 72 horas, pelo ensaio de MTT. Os resultados podem ser observados na tabela 2, no qual representa os valores da CI_{50} dos compostos estudados.

Observa-se que todos os compostos apresentaram efeito na redução da viabilidade celular na linhagem HL-60, sendo esses resultados independentes de tempo, e na linhagem K562, de modo dependente de tempo. Os resultados de PBMC apresentaram-se seletivos em 24h, reduzindo a viabilidade celular apenas no período de 72h de incubação dos compostos (LUCENA, 2014).

Tabela 2: Valores da CI_{50} obtidos pelo ensaio de MTT, após a incubação das células HL-60, K562 e PBMC com os organoselenados HSe-01 e HSe-02, por 24 e 72 horas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos em triplicata e foram obtidos usando curva de regressão não-linear

HSe Linhagem	HSe-01 (24h)	Hse-01 (72h)	Hse-02 (24h)	Hse-02 (72h)
HL-60	1,7 $\mu\text{M} \pm 0,43$	1 $\mu\text{M} \pm 0,48$	2 $\mu\text{M} \pm 0,39$	4,2 $\mu\text{M} \pm 0,37$
K562	40 $\mu\text{M} \pm 0,35$	21,4 $\mu\text{M} \pm 0,36$	42,5 $\mu\text{M} \pm 0,37$	19,4 $\mu\text{M} \pm 0,35$
PBMC	139,1 $\mu\text{M} \pm 0,5$	9,6 $\mu\text{M} \pm 0,37$	116 $\mu\text{M} \pm 0,5$	9,28 $\mu\text{M} \pm 0,41$

Fonte: Lucena, 2014

Em sequência, a fim de complementar os resultados obtidos pela técnica de MTT, foi avaliado os efeitos dos compostos organoselenados, no período de 24 e 72 horas, nas linhagens cancerígenas K562-lucena e Thp-1. As concentrações das substâncias utilizadas nos experimentos variaram entre 3,12 a 200 $\mu\text{g/mL}$. As figuras representam a porcentagem da viabilidade celular ou proliferação celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%. Os resultados foram expressão nas figuras 4 a 7.

Em K562-Lucena, o composto Hse-01 apresentou um efeito citotóxico apenas no período de 72h de incubação, com uma CI_{50} de 44,4 μM . Já o composto HSe-02 apresentou uma atividade citotóxica em ambos os períodos de incubação com CI_{50} de 135 μM e 25,72 μM , respectivamente. A linhagem Thp-1, por ser uma linhagem mais sensível, comparado com K562-Lucena, apresentou redução da viabilidade celular nos dois compostos no período de 24 e 72h, com CI_{50} em HSe-01 de 7,8 μM e 9,4 μM e em HSe-02 de 13,53 μM e 10,31 μM , respectivamente.

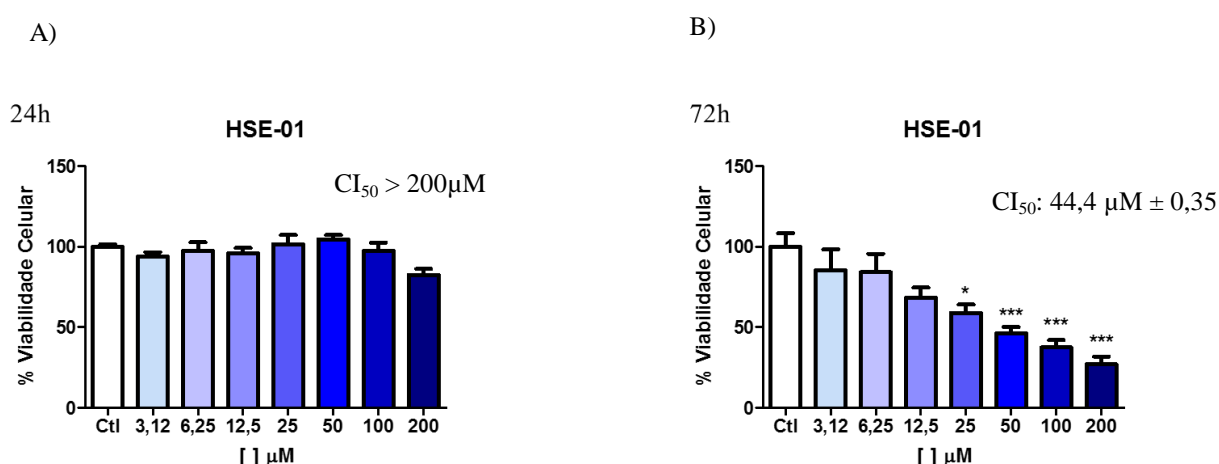


Figura 4: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre linhagem K562-Lucena após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

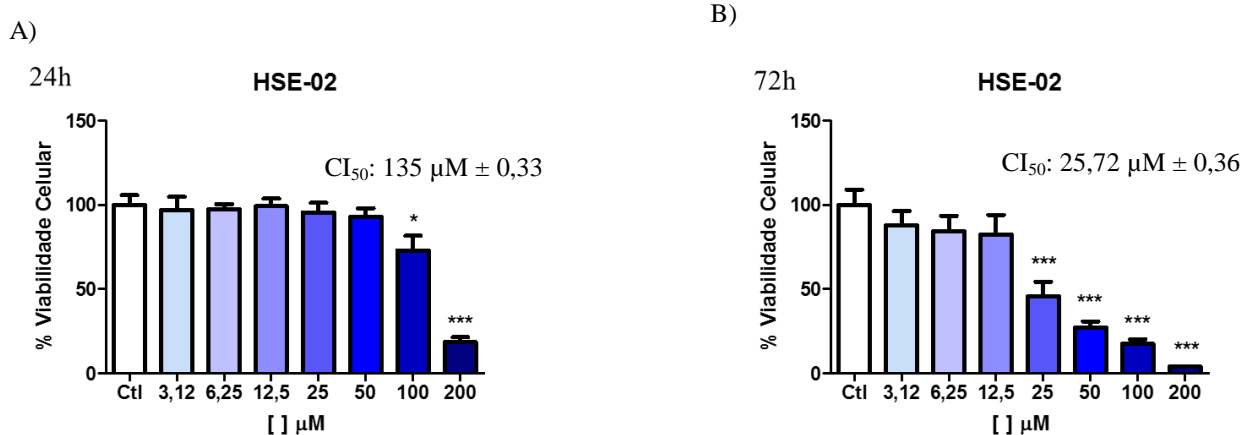


Figura 5: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre linhagem K562-Lucena após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

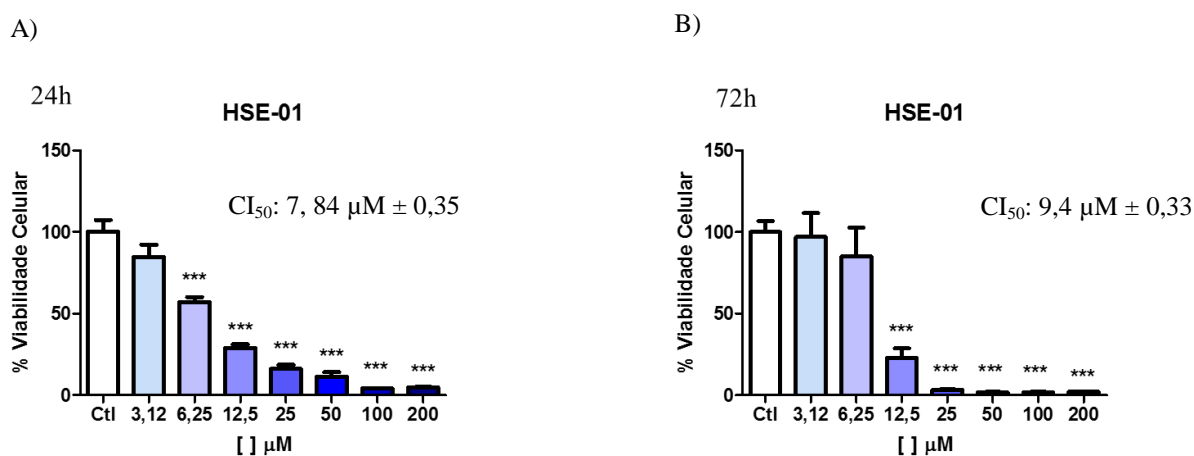


Figura 6: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre linhagem Thp-1 após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

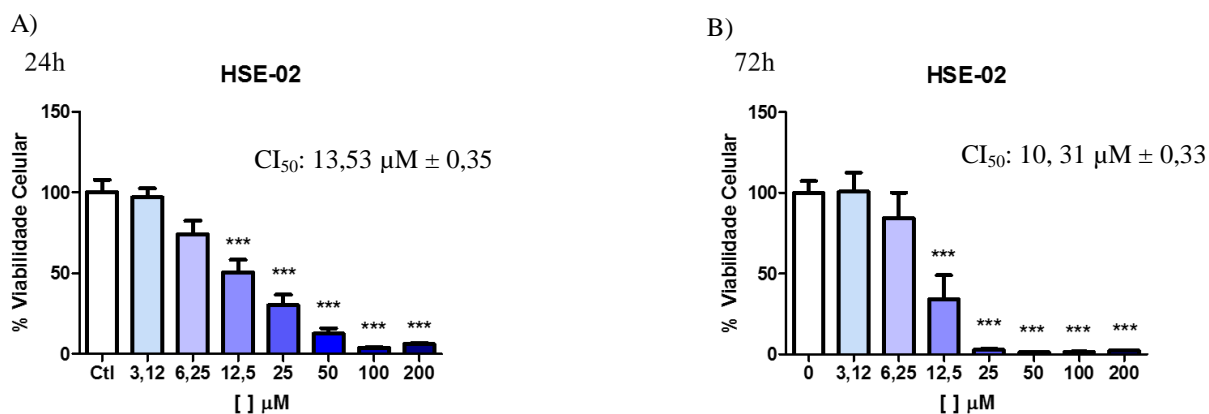


Figura 7: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre linhagem Thp-1 após 24 (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

A fim de avaliar a citotoxicidade específica dos organoselenados apenas para as linhagens cancerígenas, e complementar os resultados do PBMC realizados por Lucena (2014) foi avaliado o efeito dos compostos HSe-01 e HSe-02 frente a linhagem HUVEC através do ensaio de redução do MTT. As células foram tratadas durante 24 horas e 72 horas, com as concentrações de 3,12 μM a 200 μM , os resultados estão expressos na figura 8. O composto HSe-01 não reduziu a viabilidade celular da linhagem HUVEC após 24h de tratamento, apresentando efeito tóxico apenas em 72h de tratamento com CI_{50} de 7,3 μM . Já o composto HSe-02, reduziu a viabilidade celular em ambos os períodos de tratamento, apresentando resultados significativos desde as menores concentrações.

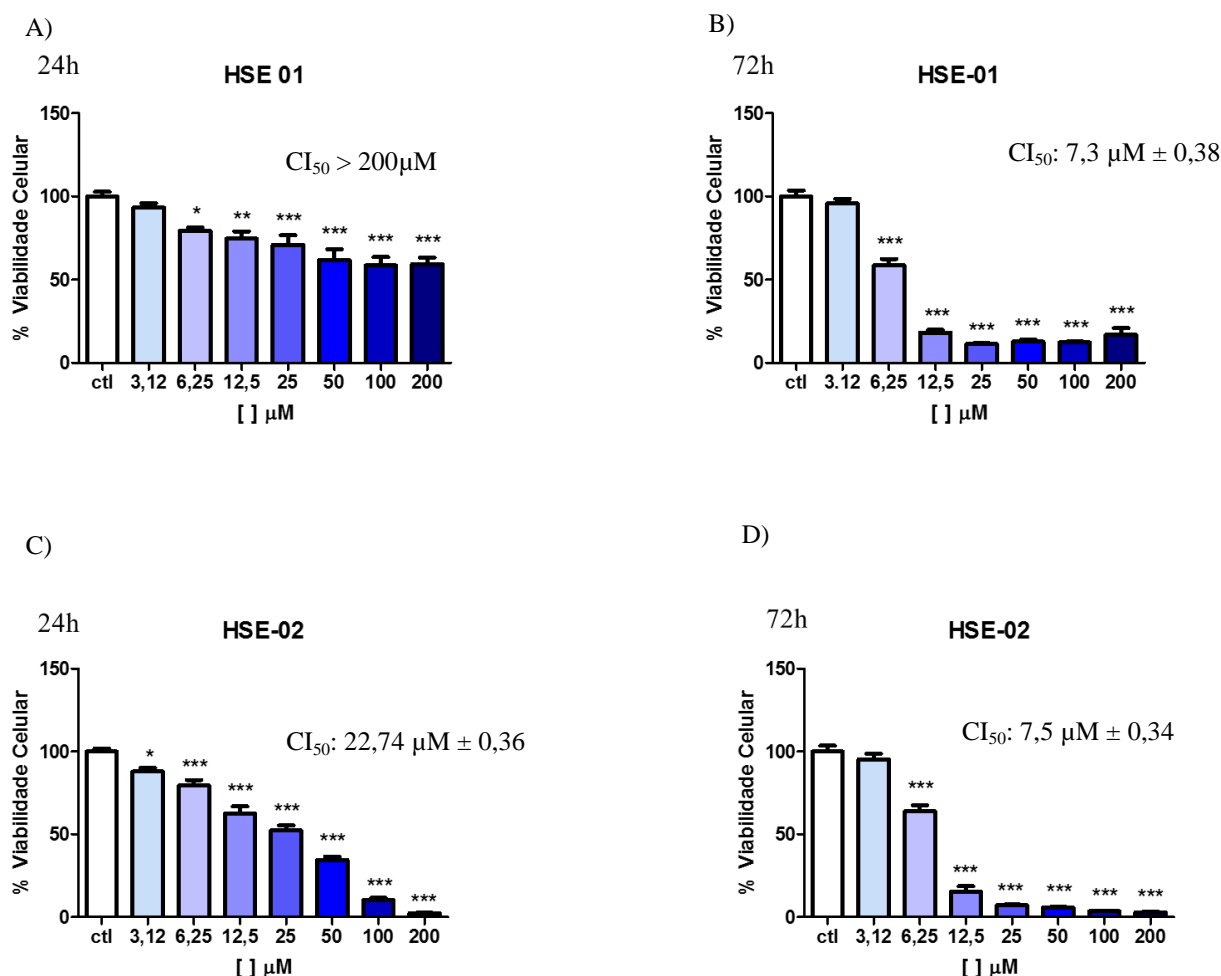


Figura 8: Efeito citotóxico dos compostos organoselenados HSe-01 (A e B), HSe-02 (C e D), sobre linhagem não tumoral HUVEC após 24 e 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

A atividade dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 também foram avaliados pelo método de exclusão do azul de tripan. Foi avaliada a porcentagem da viabilidade celular nas linhagens K562, K562-Lucena, HL-60, Thp-1 e HUVEC, por um período de tratamento de 24 e 72h, nas seguintes concentrações dos compostos: 25, 50, 100 e 200 μ M. Os resultados foram expressos nas figuras 9 a 11.

O composto HSe-01 (Figuras 9 e 10), apresentou uma redução significativa na viabilidade celular em todas as linhagens a partir da concentração de 50 μ M no período de 24h, de 100% do controle para: $70,6 \pm 3,6$ % em K562-Lucena, $60,8 \pm 2,8$ % em K562, $37,2 \pm 7,7$ em HL-60, $36,6 \pm 4,7$ em Thp-1 e $62,8 \pm 6,7$ % em HUVEC. No entanto, destaca-se que na

menor concentração avaliada pelo método de azul tripan, o composto não apresentou redução da viabilidade celular apenas em K562, no período de 24h de tratamento, com uma redução de 100% do controle para apenas $94,6 \pm 1,5$ % no tratamento de 25 μM . Após o período de 72h de tratamento, o organoselenado HSe-01 apresentou uma redução da viabilidade celular significativa já na concentração de 25 μM , com uma redução de 100% do controle para: $74,6 \pm 3,0$ % em K562-Lucena, $79,3 \pm 8,5$ % em K562, $46,8 \pm 6,7$ em HL-60, $27,5 \pm 1,6$ em Thp-1 e $7,6 \pm 1,0$ % em HUVEC.

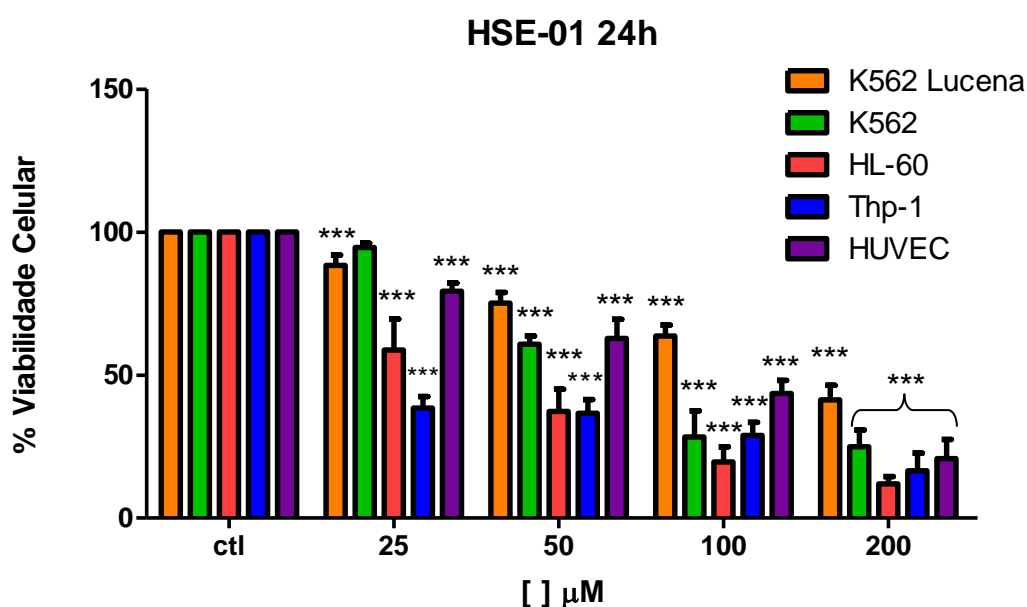


Figura 9: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 24 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

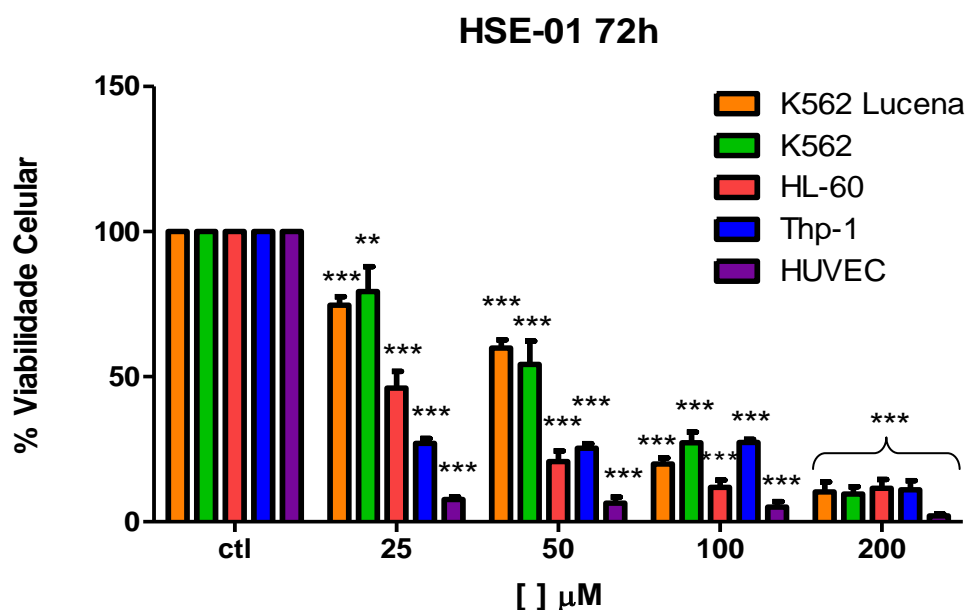


Figura 10: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-01 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 72 horas de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

O composto HSe-02 (Figura 11), por sua vez, apresentou uma redução significativa na viabilidade celular em todas as linhagens a partir da concentração de 25 μ M no período de 24h, de 100% do controle para: $83,4 \pm 3,7$ % em K562-Lucena, $85 \pm 2,0$ % em K562, $61,6 \pm 6,3$ em HL-60, $34,9 \pm 2,9$ em Thp-1 e $77,7 \pm 12,7$ % em HUVEC. Após o período de 72h de tratamento, o organoselenado HSe-02 também apresentou uma redução da viabilidade celular significativa a partir da concentração de 25 μ M, com uma redução de 100% do controle para: $73,7 \pm 3,4$ % em K562-Lucena, $81,6 \pm 3,3$ % em K562, $56,2 \pm 1,9$ em HL-60, $61,7,5 \pm 1,9$ em Thp-1 e $18,9 \pm 3,3$ % em HUVEC.

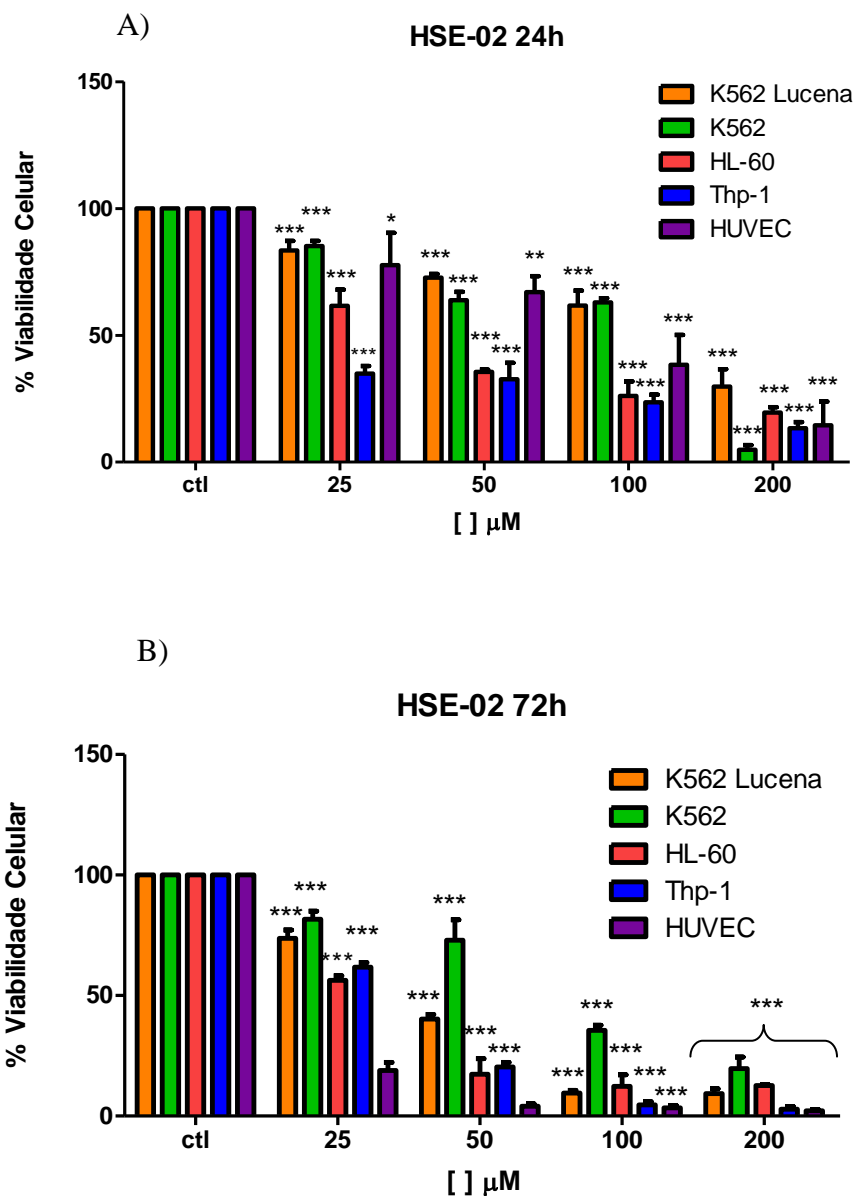


Figura 11: Efeito citotóxico do composto organoselenado HSe-02 sobre as linhagens K562-Lucena, K562, HL-60, Thp-1 e HUVEC, após 24 horas (A) e 72 horas (B) de tratamento, avaliado pelo ensaio de exclusão do azul tripan. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de dois experimentos independente em duplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

4.2. Avaliação do tipo de morte celular

Os ensaios de análise das características de morte celular foram utilizados com o auxílio do Citometro de fluxo, usando o programa Cell Quest para leitura e análise das amostras. Avaliou-se o mecanismo de ação dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 na linhagem K562 (linhagem selecionada por apresentar um melhor efeito citotóxico em

ambos os compostos, apesar de ser considerada uma linhagem resistente), por um período de incubação de 24 horas. As concentrações utilizadas em todos os ensaios foram de 10, 20 e 40 μM para ambos os compostos. As concentrações máximas testadas equivalem aos valores aproximados da CI_{50} .

4.2.1. Efeitos dos compostos organoselenados na integridade da membrana plasmática de células K562

No ensaio de integridade da membrana plasmática, as células controle e as células em tratamento com os compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 foram incubadas com iodeto de propídeo, afim de avaliar sua penetração nas células com a membrana danificada ou disfuncional.

Os resultados expressos na figura 12 indicam que os compostos organoselenados não alteraram de maneira significativa a integridade da membrana no período de tratamento de 24h. Dessa forma, os resultados sugerem que a ação citotóxica dos organoselenados não envolve o processo de necrose, pois a membrana apresenta-se íntegra nos valores da CI_{50} .

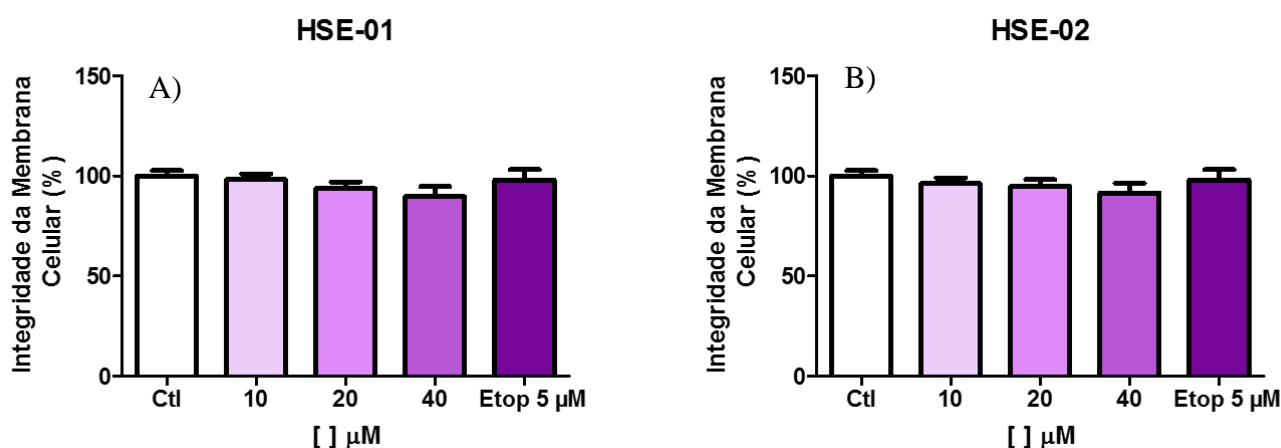


Figura 12: Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo nas células K562 após o tratamento de 24h com os compostos HSe-01 (A) e HSe-02 (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. Ctl: controle.

4.2.2. Efeito dos compostos organoselenados na distribuição do DNA nas fases do ciclo celular

Danos no ciclo celular podem ser reparadas por mecanismos específicos em cada uma das fases, permitindo a célula progredir no ciclo celular e dividir-se ou então, os mecanismos de reparo podem não ser efetivos e ativar mecanismos de morte (DANTAS, 2014). A progressão das células nas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo usando IP.

O composto HSe-01 de forma concentração- dependente, causou aumento significativo da fração subdiploide (fração onde a célula apresenta apenas metade do seu número de cromossomos) (Sub-G1) de $9,1 \pm 1.9\%$ no controle para $12,5 \pm 1.2\%$ e $15,6 \pm 1.3\%$ nas concentrações de 20 e 40 μM , respectivamente. Além disso, o HSe-01 causou parada no ciclo celular, aumentando a concentração de DNA na fase G1 de $38,6 \pm 3,2\%$ no controle para $51,8 \pm 3\%$ na concentração de 40 μM . Os dados foram expressos na tabela 3 e figura 13.

Tabela 3: Efeito do composto HSe-01 na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular nas células de K562

Fase \ []	CTL (%)	10μM (%)	20μM (%)	40μM (%)	ETOP 5μM (%)
Sub-G1	$9,1 \pm 1.9$	$10,52 \pm 0,8$	$12,5 \pm 1.2$	$15,6 \pm 1.3$	$14,8 \pm 1,4$
Go/G1	$38,6 \pm 3,2$	$40,5 \pm 3,1$	$41,1 \pm 4.7$	$51,8 \pm 3$	$16,35 \pm 0,119,6$
S	$25,4 \pm 4,5$	$27,4 \pm 3,1$	$28,9 \pm 4,8$	$22,2 \pm 2,2$	$28,6 \pm 6,5$
G2/M	$21,1 \pm 1,9$	$19,6 \pm 2,7$	$16,2 \pm 1,5$	$9,22 \pm 1,7$	$32,8 \pm 1,6$

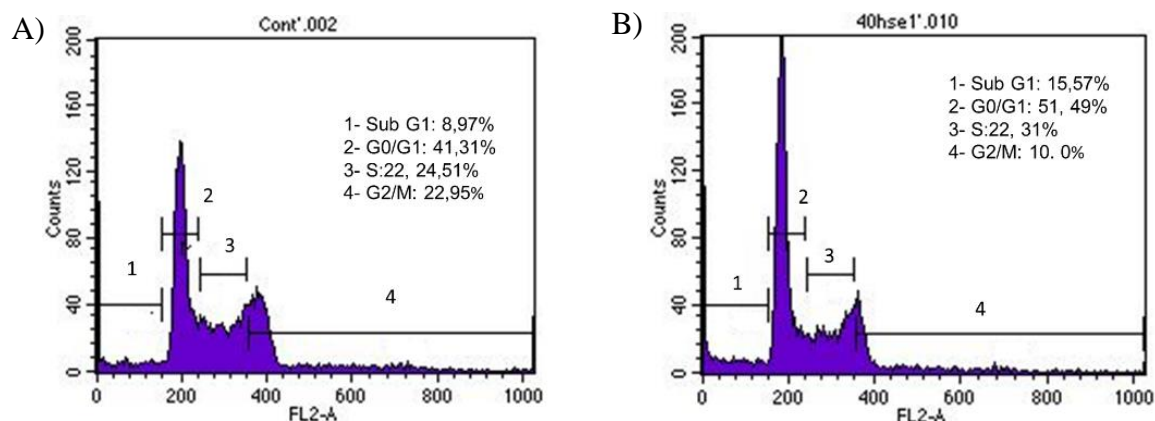


Figura 13: Efeito do composto HSe-01 sobre a distribuição do DNA nas fases do ciclo celular após 24h de tratamento. Os histogramas representam o controle (A) e a exposição das células ao HSe-01 na concentração de 40 μ M (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento.

O composto HSe-02, de maneira similar ao composto HSe-01, ocasionou aumento significativo da fração subdiploide (Sub-G1) de $9,1 \pm 1,9\%$ no controle para $12,2 \pm 1,2\%$ e $15,9 \pm 1,3\%$ nas concentrações de 20 e 40 μ M, respectivamente. Além disso, o HSe-02 também causou parada no ciclo celular, aumentando a concentração de DNA na fase G1 de $38,6 \pm 3,2\%$ no controle para $45 \pm 1,3\%$ na concentração de 20 μ M e $45,4 \pm 4\%$ na concentração de 40 μ M. Os dados foram expressos na tabela 4 e na figuras 14.

Tabela 4: Efeito do composto HSe-02 na distribuição do DNA ao longo do ciclo celular nas células K562

Fase \ []	CTL (%)	10 μ M (%)	20 μ M (%)	40 μ M (%)	ETOP 5 μ M (%)
Sub-G1	$9,1 \pm 1,9$	$12,57 \pm 2,1$	$15,2 \pm 2,5$	$15,96 \pm 2,4$	$14,8 \pm 1,4$
Go/G1	$38,6 \pm 3,2$	$36,6 \pm 3,2$	$45,0 \pm 1,3$	$45,4 \pm 4$	$16,35 \pm 0,119,6$
S	$25,4 \pm 4,5$	$27,1 \pm 3,5$	$25,1 \pm 2,7$	$26,3 \pm 1,9$	$28,6 \pm 6,5$
G2/M	$21,1 \pm 1,9$	$22,0 \pm 0,8$	$13,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 3,3$	$32,8 \pm 1,6$

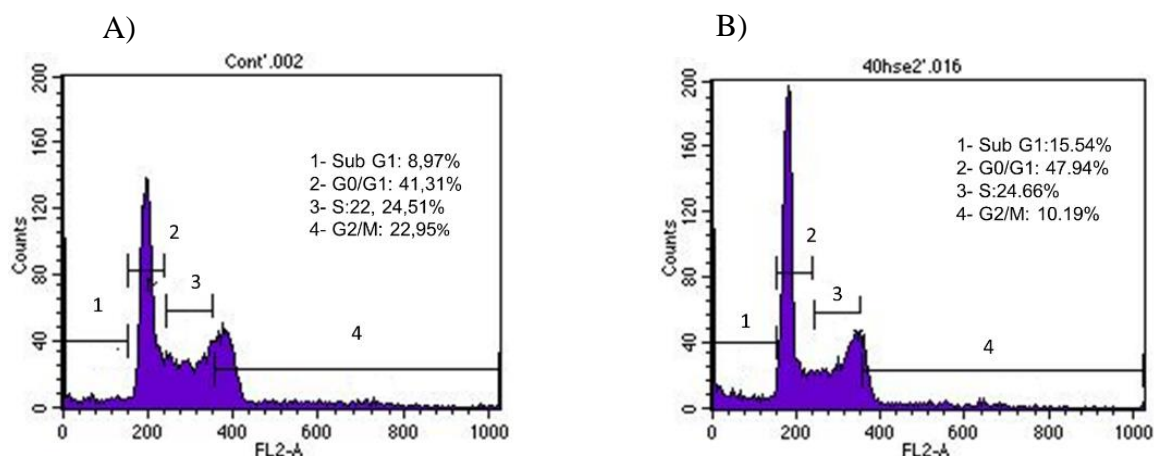


Figura 14: Efeito do composto HSe-02 sobre a distribuição do DNA nas fases do ciclo celular após 24h de tratamento. Os histogramas representam o controle (A) e a exposição das células ao HSe-02 na concentração de 40 μ M (B).

4.2.3. Efeito dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 no potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A mitocôndria é uma das principais organelas responsáveis pela bioenergia celular, como já citado, ela está presente em diversos processos de sinalização e crescimento celular, além de participar de um dos principais tipos de morte celular, a apoptose. A alteração do potencial transmembrânico foi avaliado através da marcação das mitocôndrias viáveis com a tetrametilrodamina (TRMR) em citometria de fluxo.

A figura 15 mostra o efeito dos organoselenados no potencial de membrana mitocondrial. Foi observado que ambos os compostos promoveram a despolarização da mitocôndria a partir da concentração de 20 μ M. O HSe-01 promoveu de 12,4 \pm 4.1% do controle para 23,6 \pm 7,6 e 28,8 \pm 6,2% de despolarização na concentração de 20 e 40 μ M, respectivamente. O HSe-02, por sua vez, promoveu despolarização nas concentrações de 20 e 40 μ M de 12,4 \pm 4.1% do controle para 31,7 \pm 4,8 e 31,1 \pm 6,8%, respectivamente. O CCP promoveu uma despolarização de 12,4 \pm 4.1% do controle para 69,58%, comprovando assim a eficácia da tetrametilrodamina.

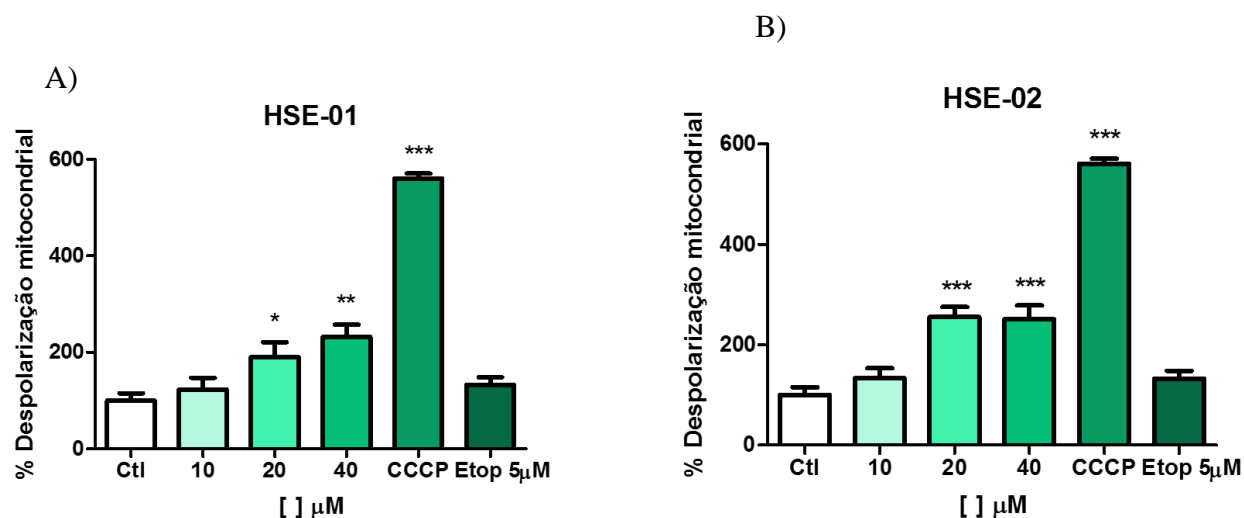


Figura 15: Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo nas células K562 após o tratamento de 24h com os compostos HSe-01 (A) e HSe-02 (B). Pelo menos cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O câncer, atualmente, está entre um dos maiores problemas de saúde pública, devido a sua alta taxa de incidência e baixa seletividade aos atuais métodos de tratamento. Isso ocorre, devido as características específicas das células cancerígenas, por exemplo: alta capacidade de proliferação celular, indução a angiogênese, resistência a sinais de morte celular e a múltiplas drogas. Desse modo, o câncer tem se tornado um grande desafio à comunidade científica nos últimos tempos, no que se refere a busca por novas terapias mais eficientes, nos quais tenham uma seletividade para tecidos e células cancerígenas, gerando um menor dano ao organismo (SHEIKH et al, 2012; GREAVES et al, 2012).

Como consequência dessa grande relevância que o câncer vem ganhando nos últimos tempos, o incremento da pesquisa, tem obtido melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados a esta doença, o que permite a descoberta e síntese de novos compostos com atividade antitumoral, de acordo com o seu potencial citotóxico e sua seletividade apenas para as células cancerígenas (SANMARTÍN et al., 2005). Dentre eles, os compostos contendo selênio na sua estrutura química vem demonstrando importantes efeitos quimiopreventivos contra o câncer, tanto em ensaios, *in vitro*, quanto *in vivo*, sendo correlacionados com a regulação do ciclo celular, estimulação da apoptose e inibição da migração e invasão do tumor a outros tecidos (SANMARTÍN et al, 2012).

Os compostos selenados podem ter diferentes estruturas químicas e agir em diferentes alvo na terapia do câncer. A preocupação da toxicidade de compostos selênio inorgânicos, muitas vezes limita a sua utilização na quimioprevenção, embora possam ter uma atividade anticâncer equivalente ou superior aos compostos orgânicos. Em contrapartida, vista a sua baixa toxicidade á células normais, aliado ao fato de que os humanos já são expostos de maneira natural a diversos compostos orgânicos contendo selênio na sua composição, os pesquisadores estão se concentrando em compostos organoselenados buscando uma melhor atividade anticâncer (RIZVI et al, 2014).

Diversos compostos organoselenados já apresentaram atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas em diversas linhagens de câncer humano. Estudos também mostram a inibição da angiogênese, processo chave para a progressão e disseminação do câncer. Além disso já foi relatado que compostos organoselenados podem inibir a atividade de resistência a múltiplas drogas, podendo potencializar a eficácia da quimioterapia e radioterapia (BIJIAN et

al, 2012).

Nesse trabalho, dando continuidade ao estudo dos organoselenados já previamente realizados no laboratório, foi realizado um “screening” com os compostos HSe-01 e HSe-02 com as linhagens K562-Lucena e Thp-1 pelo ensaio de MTT, com o objetivo de complementar os resultados já obtidos por Lucena (2014) (tabela 2). A experimentação *in vitro* com cultivo celular é extremamente útil para analisar a resposta celular a novas drogas (CASTRO et al, 2013). A técnica de MTT foi escolhida por ser um método rápido, econômico e capaz de avaliar a viabilidade celular de diferentes linhagens após o tratamento de novos compostos.

Observou-se que os compostos HSe-01 e HSe-02 foram citotóxicos em Thp-1 nos períodos de 24 e 72h dependentes de concentração e independentes de tempo. Contudo em K562-Lucena, eles só apresentaram atividade no período de 72h de tratamento. Esse resultado se deve ao fato da linhagem K562-Lucena possuir uma superexpressão da proteína P, proteína da superfamília ABC de transportadores ativos. Esta proteína funciona como uma bomba de efluxo dependente de energia, capaz de transportar drogas para o exterior da célula, diminuindo a concentração intracelular a níveis subletais. (WAGNER-SOUZA et al, 2003). Os resultados do MTT corroboram com diversos estudos na literatura que mostram a atividade de compostos organoselenados a diversos tipos de tumores, como hepatocarcinoma, câncer de próstata, câncer de mama e adenocarcinoma colorretal. (YIN et al., 2012; SHI et al, 2003; ESTEVEZ et al., 2014).

O efeito citotóxico pode se manifestar pela alteração de diversas funções e/ou estruturas celulares, assim o uso de um único método pode ser inadequado ou pouco sensível para caracterizar o efeito de um novo composto (SCHROTEROVÁ et al, 2009). Dessa maneira foi realizado o ensaio de exclusão do azul de tripan com os dois organoselenados em todas as linhagens avaliadas na técnica de MTT.

Segundo a literatura, a necrose normalmente ocorre em consequência de uma lesão celular. Pesquisas recentes têm revelado que o início do processo necrótico pode depender da concentração do composto usado e da duração do tratamento, considerando que a indução de necrose é uma resposta tardia relativa ao acontecimento da apoptose. Assim, eventos intracelulares que levam a apoptose e necrose podem ocorrer sequencialmente, onde numa concentração relativamente baixa do composto testado ocorre colapso no potencial de

membrana mitocondrial e posteriormente, usando uma maior concentração, ocorre o rompimento da membrana plasmática, levando ao processo necrótico (ROY, 2006; FAHEINA-MARTINS, 2009).

A avaliação da citotoxicidade basal feita por meio da exclusão por azul de tripan mostrou que os compostos HSe-01 e HSe-02 induziu redução da viabilidade celular por dano na membrana celular em todas as linhagens testadas, corroborando com os dados do MTT desse presente trabalho. No entanto, a linhagem K562 apresentou-se resistente ao dano na membrana no período de 24h, reduzindo a sua viabilidade apenas nas maiores concentrações.

Esses resultados sustentam a hipótese que os compostos organoselenados induzam primariamente necrose nas linhagens trabalhadas, exceto nas células K562, por ser característica desse tipo de morte celular a perda da integridade da membrana nos estágios iniciais (KROEMER et al, 2009). No entanto, mais estudos devem ser realizados para a comprovação dessa hipótese.

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de uma substância é um parâmetro importante quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica desta. Muitas drogas citotóxicas não tendem a ser seletivas em suas ações, agindo e danificando as células viáveis (ANAZETTI et al., 2003). Lucena (2014), realizou o ensaio de MTT com as células de PBMC, no qual os compostos não demonstraram efeito significativo em 24h. Esse trabalho realizou pelo ensaio de MTT e azul de tripan a avaliação citotóxica das células não tumorais HUVEC. Os compostos organoselenados utilizados mostraram-se mais ativos contra as linhagens tumorais no período de 24h pelo ensaio de MTT e azul de tripan, o que tornou estas moléculas interessantes para um estudo mais aprofundado do mecanismo de morte induzido nas linhagens.

A hematopoiese é um processo rápido e contínuo de produção de células específicas do sangue a partir de células precursoras. A desregulação desse processo pode levar a uma proliferação excessiva, causando o acúmulo de células progenitoras hematopoiéticas anormais não diferenciadas, levando ao quadro de leucemia (ZHOU, 2014; LUCENA, 2014). Levando em consideração a sua origem, as leucemias podem ser agrupadas em: leucemia mielóide (derivadas de precursores de granulócitos ou monócitos), linfóide (derivadas de precursores de células B ou T) ou eritróide (derivadas de precursores de hemácias), além disso, elas podem se dividir em crônicas e agudas, dependendo da característica clínica da doença

(POKHAREL, 2012).

Para investigar os mecanismos moleculares associados ao mecanismo de morte celular dos compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02, por meio de fluorocromos e citometria de fluxo, foi selecionado a linhagem leucemia mielóide crônica, K562, devido aos seus resultados terem sido mais significativos nos métodos de MTT e azul de tripan. Essa linhagem, apesar de não ser considerada uma MDR como a K562-Lucena, também expressa uma bomba de efluxo capaz de mover fármacos do meio intracelular para o meio extracelular, portanto ela também é considerada uma linhagem resistente.

As leucemias estão entre os dez tipos de câncer que mais afeta a população brasileira, e a leucemia mielóide crônica (LMC) compreende 14% dos casos de leucemias, sendo estimado cerca de 1 a 2 casos em cada 100 mil indivíduos (DANTAS, 2014; SESSIONS et al, 2007). Esse tipo de leucemia é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação clonal de células mielóides, resultado da transformação maligna de uma célula-tronco pluripotente (*stem cell*). É caracterizada em 95% dos casos pela presença de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22, que resulta em um cromossomo marcador chamado "Philadelphia" (Ph1) (ANDRADE, 2015).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo natural e necessário para o desenvolvimento fetal e embrionário e para a remodelação de tecidos. Esse tipo de morte também é necessário como mecanismo de defesa em reações imunes ou quando as células são danificadas por agentes nocivos. A supressão dos mecanismos apoptóticos está envolvida tanto no processo de carcinogênese e manutenção do fenótipo maligno quanto no desenvolvimento de resistência a drogas (O'BRIEN et al, 2008; CORDEU et al, 2007).

Os efeitos da maioria dos quimioterápicos e o sucesso dos atuais esquemas de intervenção terapêutica para o tratamento do câncer, como radioterapia e imunoterapia, dependem fortemente da capacidade de induzir a célula tumoral a desencadear sua morte por apoptose. Então, o desenvolvimento de drogas que tenham como alvo as vias intracelulares e moléculas envolvidas na execução da morte apoptótica constitui uma das estratégias terapêuticas na área da oncologia (MOFFITT et al, 2010; OLA et al, 2011; LACERDA, 2012).

A apoptose ocorre em uma sequência de eventos morfológicos e moleculares, onde se destacam: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, fragmentação da membrana e formação dos corpos apoptóticos, parada no ciclo celular e alteração do potencial transmembrânico (FADEEL et al, 2005; TORRES et al, 2012).

Os compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 não alteraram a integridade da membrana celular em K562 após período de 24 horas de tratamento, em nenhuma das concentrações avaliadas por citometria de fluxo. Esses resultados demonstram características de morte celular por apoptose que, como já citado anteriormente, esse tipo de morte possui como característica uma fragmentação da membrana celular, apenas no final do seu estágio, com formação dos corpos apoptóticos que irão ser fagocitados, sem que ocorra a formação de um processo inflamatório (ELMORE, 2007).

O ciclo celular é caracterizado como uma sequência de eventos regulados por diversas proteínas que permite o crescimento e replicação de diversos tipos de células. Os pontos de verificação de controle ao longo do ciclo, denominados “checkpoints”, são coordenados por cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e podem ser encontrados nas intermediações entre a fase G1 para a fase S e da G2 para a fase M. Um aumento da expressão das CDKs nos pontos de controle entra a fase G1-S são encontradas na maioria das células cancerígenas, resultando em um aumento da proliferação celular e supressão da morte celular (FOSTER, 2008).

Estudos relatam que as prováveis resistências às terapias atuais estão relacionadas, principalmente, a alterações nos níveis de expressão das CDKs. Portanto, o desenvolvimento atual de drogas anticâncer vêm se voltado para a busca de alvos que estejam envolvidos na progressão do ciclo celular. Com o objetivo de: reduzir a velocidade de progressão do ciclo, favorecer a reparação do material lesado ou, caso as vias de sinalização desencadeiem um mecanismo irreversível, a ativação de vias apoptóticas (FOSTER, 2008; KASTAN et al, 2004).

Os compostos organoselenados HSe-01 e Hse-02 induziram um aumento do DNA hipodiplóide (pico sub-G1) e parada no ciclo celular G0/G1. A fase sub-G1 corresponde a um grupo de células com dano no material genético, sugerindo uma possível indução de apoptose pelos compostos na linhagem de K562. Além disso, a parada no ciclo celular na fase G1, também é um fator de indução a apoptose, podendo estar relacionada a ativação do gene supressor tumoral p53 ou inibição da super expressão de CDKs (COULIDIATI, 2014).

Os resultados expressos nesse trabalho com o ciclo celular corroboram com dados já explanados na literatura. Zeng et al (2010), demonstraram que compostos organoselenados obtiveram um efeito similar aos inorgânicos, com parada no ciclo celular na fase G0/G1 em células de câncer de colo. Okuno et al (2014), em seus estudos com células de câncer de pulmão, também apresentou como atividade compostos organoselenados parada no ciclo celular e consequente indução da apoptose. De fato, estudos relatam que a parada no ciclo celular e apoptose é o maior mecanismo pelo qual compostos organoselenados exercem seu efeito anticancerígeno (IP, 1998; ZENG et al, 2010; LEE et al, 2013).

Várias mudanças na biogênese e na função da mitocôndria estão associados a apoptose. Uma das vias de sinalização que iniciam o processo apoptótico é a via intrínseca, no qual os estímulos externos e internos causados por fatores como danos ao DNA e agentes citotóxicos, atuam causando alterações na mitocôndria, resultado em uma diminuição no potencial transmembrânico. Estudos relatam que a queda do potencial transmembrânico durante o processo apoptótico ocorre antes mesmo da fragmentação do DNA em fragmentos oligonucleossomais (COULIDIATI, 2014).

Os organoselenados HSe-01 e HSe-02 promoveram despolarização mitocondrial de forma concentração-dependente nas células K562, a partir da concentração de 20 μ M. ($p < 0,01$). Assim, constatou-se que, possivelmente, o mecanismo de morte celular pelo qual esses compostos atuam é via apoptose e está intimamente relacionado a alterações no potencial transmembrânico mitocondrial. Esses resultados estão de acordo com resultados expressos por Poerschke et al (2011), no qual afirmam que compostos contendo o selênio na sua estrutura tem como característica crucial de morte celular a despolarização da mitocôndria.

Diante todos os dados obtidos nesse trabalho, pode-se relatar que os compostos organoselenados HSe-01 e HSe-02 demonstram um bom potencial anticâncer sobre as linhagens leucêmicas, comportando-se como potenciais drogas candidatas para o tratamento do câncer, sendo necessários análises complementares do mecanismo de morte apoptótico e testes de análise pré-clínico *in vivo*.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- ✓ Os compostos organoselenados foram citotóxicos e seletivos para as células tumorais HL-60, K562, K562-Lucena e Thp-01.
- ✓ Os compostos organoselenados reduziram a viabilidade celular nas linhagens tumorais HL-60, K562-Lucena e Thp-1 e na linhagem não tumoral HUVEC, mas não possuiu efeito significativo em K562 no período de 24h.
- ✓ Os compostos organoselenados não causaram danos a membrana celular na linhagem K562.
- ✓ Os compostos organoselenados aumentaram a concentração de DNA subdiploide e induziram a parada do ciclo na fase G0/G1 na linhagem K562.
- ✓ Os compostos organoselenados causaram despolarização do potencial transmembrânico mitocondrial na linhagem K562.
- ✓ Os compostos organoselenados induziram, possivelmente, morte celular por apoptose na linhagem K562, sendo o composto Hse-01 mais promissor que o composto Hse-02, estando intimamente relacionados a parada no ciclo e despolarização da mitocôndria.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ANAZETTI, M. C. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular Apoptosis Cell Death: biochemistry and molecular aspects. p. 37–58, 2007.
- ANAZETTI, M. C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, n. 2-3, p. 261–274, 2003.
- ANDRADE, G. V. Papel da P190 BCR-ABL como parâmetro de recaída na leucemia mielóide crônica. **Rev. Bras. Hematol.** v. 30, p. 297–302, 2008. BASH, E. No Title No Title. **PhD Proposal**, v. 1, p. 1–100, 2015.
- Brasil. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- Brasil. **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
- BELLINGER FP; RAMMAN, A.V.REEVES, M.A., BERRY MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. **Biochem J.**; 422(1): 11–22, 2010.
- BATTIN,E.E.; ZIMMERMAN, M.T.; RAMOUTAR,A.R.; QUARLES, C.E; BRUMAGHIM, J.L. Preventing metal-mediated oxidative DNA damage with selenium compounds. **Metallomics** 3, 503–512, 2011.
- BIJIAN, K.; ZHANG, Z.; XU, B.; JIE, S.; CHEN, B.; WAN, S.; WU, J.; JIANG, T. ALAOUI-JAMALI, A. Synthesis and biological activity of novel organoselenium derivatives targeting multiple kinases and capable of inhibiting cancer progression to metástases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V 48. 143-152, 2012.
- COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**. v. 326, p.1-16, 1997.
- CASTRO, J.J. MÉNDEZ, J.P; CORAL-VÁZQUEZ, R.M. SORIANO-URSÚA, M.A.; DAMIAN-MATSUMURA, P.; BENÍREZ-GRANADOS, J. ROSAS-VARGAS, H.;CANTO, P. In vitro and molecular modeling analyses of two mutante desert hedgehog proteins associated with 46,XY gonadal dysgenesis. **DNA Cell Biol.**, v. 32, n.9, p. 524-530, 2013.

- CORDEU, L. et al. Biological profile of new apoptotic agents based on 2,4-pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1659–1669, 2007.
- CORELLA, D. et al. Cancer mortality and exposure to chemical carcinogens in the work place: An ecological study in the Valencian Community, Spain (1981-1995). **European Journal of Epidemiology**, v. 16, n. 5, p. 401–409, 2000.
- COSTA-SOUZA, F. Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: **A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.
- COULIDIATI, H. T. **Avaliação dos efeitos anticancerígenos dos 1,2,3-triazóis derivados do núcleo 1,4-naftoquinona em linhagens leucêmicas humanas**. (Tese) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.
- DANTAS, B.B. **Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano**. (Dissertação). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.
- EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193–236, 2002.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**. v. 391, p. 43-50, 1998.
- ESTEVEZ, H. et al. Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 184–193, 2014.
- FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, n. 6, p. 479–517, 2005.
- FAHEINA-MARTINS, G.V. **Avaliação do Potencial Citotóxico das lectinas de *Canavalia Ensiformis*, *Canavalia Brasiliensis* e *Cratylia Floribunda***. (dissertação) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2009.

- FERREIRA, C. G., ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2010.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. p. 144–149, 2008.
- FREITAS, B. C. **Avaliação do potencial citotóxico do carvacrol sobre células normais e tumorais**. (Dissertação) Universidade Federal da Paraíba, 2010.
- FRESHNEY, I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, n. 4-5, p. 213–230, 2001.
- GALLUZZI, L.; PEDRO, J.M.B.S., KROEMER, G. Organelle-specific initiation of Cell death. **Nature Cell biology**. v. 16 n.08, 2014.
- GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature** p. 810–816, 2000.
- HUK, A. et al. Impact of nanosilver on various DNA lesions and HPRT gene mutations - effects of charge and surface coating. **Particle and fibre toxicology**, v. 12, n. 1, p. 25, 2015.
- IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J Nutrition**, v. 128, n. 11, p. 1845–1854, 1998.
- JAFARNEJAD, S. M.; LI, G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, p. 1–19, 2011.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–323, 2004.
- KHOO, B. Y.; CHUA, S. L.; BALARAM, P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2188–2199, 2010.
- KIM, C.; LEE, J. Synthesis of new diorganodiselenides from organic halides : their antiproliferative effects against human breast cancer MCF-7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, p. 659–665, 2015.

- KROEMER, G. et al. Classification of Cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**, v. 12, p.1463-1467, 2005.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.
- KYE, S. Y. et al. Cancer Risk Factors in Korean News Media: a Content Analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 731–736, 2015.
- LEE, S. et al. Icilin inhibits E2F1-mediated cell cycle regulatory programs in prostate cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 4, p. 1005–1010, 2013.
- LACERDA, A. S. **Caracterização do potencial anticâncer do composto A398, um derivado inédito da podofilotoxina.** (Tese) Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2012.
- LUCENA, C.C.O. **Avaliação do potencial anticâncer de compostos organoselenados.** Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.
- MOFFITT, K. L.; MARTIN, S. L.; WALKER, B. From sentencing to execution – the processes of apoptosis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. p. 547–562, 2010.
- MURTHY, C. K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. The natural alkaloid berberine targets multiple pathways to induce cell death in cultured human colon cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 688, n. 1-3, p. 14–21, 2012.
- NAGATA, S. Apoptotic DNA Fragmentation. **Experimental Cell Research**. v.256, p.12-18, 2000.
- NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 3, p. 67–70, 2001.
- O'BRIEN, M. A.; KIRBY, R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 572–585, 2008.
- OKUNO, T. et al. Glutathione-dependent cell cycle G1 arrest and apoptosis induction in human lung cancer A549 cells caused by methylseleninic acid: comparison with sodium selenite. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 37, n. 11, p. 1831–7, 2014.

- OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, n. 1-2, p. 41–58, 2011.
- POERSCHKE, R. L.; MOOS, P. J. Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 211–221, 2011.
- POKHAREL, M. Leukemia : A Review Article. **International Journal of Advanced Research in Pharmacuetical & Bio Sciences**, v. 2, n. 3, p. 397–407, 2012.
- PRABHU, K. S.; LEI, X. G. Selenium. **Advances in Nutrition**, v. 7, p. 415–417, 2016.
- RAI, N.K.; TRIPATHI, K.; SHAMA, D.; SHUKLA V.K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **The International journal Lower Extremity Wounds**. v. 4, p.138-144, 2005.
- RANG, H.P. DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256–1268, 2012.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: A global perspective. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1–13, 2003.
- RISHER, J. et al. Toxicological Profile for Selenium. **ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, p. 1–457, 2003.
- RIZVI, M. A. et al. An investigation of in vitro cytotoxicity and apoptotic potential of aromatic diselenides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3440–3446, 2014.
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.
- ROY, M.K.; TAKENAKA, M.; KOBORI, M.; NAKAHARA, K.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Apoptosis, Necrosis and Proliferation-inhibition by Cyclosporine A in U937(a human monocytic cell line). **Pharmacological Research**. v. 53, p.293-302, 2006.
- SANMARTÍN, C.; ECHEVERRÍA, M.; MENDÍVIL, B.; et al. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and

apoptosis inducers. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 6, p. 2031–44, 2005.

- SANMARTÍN, C. et al. Synthesis and pharmacological screening of several aroyl and heteroaroyl selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3313–3338, 2009.
- SANMARTÍN, C.; PLANO, D.; PALOP, J. A. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1020–31, 2008.
- SANMARTÍN, C. et al. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: An overview for cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9649–9672, 2012.
- SCHROTEROVÁ, L. et al. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 7, p. 1406–1411, 2009.
- SESSIONS J. Chronic Myeloid Leukemia in 2007. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, v13, 2007.
- SHEIKH, S. et al. Toxicity of a novel herbomineral preparation las01 on human cancer cell lines and its safety profile in humans and animals. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- SHI, C. et al. A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. v. 309, p. 578–583, 2003.
- SNODIN, D. J. An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 161–168, 2002.
- SPRUCK, C. H. et al. hCDC4 Gene Mutations in Endometrial Cancer hCDC4 Gene Mutations in Endometrial Cancer 1. n. 858, p. 4535–4539, 2002.
- SUZUKI, M.; ENDO, M.; SHINOHARA, F. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. p. 475–484, 2010.
- TORRES, F.; FADEEL, B. Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials. **Accounts of Chemical Research** ' 733 Received on January, v. 21, n. 21, p. 733–742, 2012.
- TRAN, S. L. et al. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 2–7, 2011.

- VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**. v.102, p.43–53, 2000.
- WAGNER-SOUZA, K.; MELETTI-DE-OLIVEIRA, M. C.; MAIA, R. C. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 103–112, 2002.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. Rio de Janeiro: Artmed, 2008.
- YIN, S. et al. Methylseleninic acid potentiates multiple types of cancer cells to ABT-737-induced apoptosis by targeting Mcl-1 and Bad. **Apoptosis**, v. 17, n. 4, p. 388–399, 2012.
- YOSHIDA, K.; MIKI, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. **Cancer Sci**. v.101, n. 4, p. 831- 835, 2010.
- ZENG, H.; BOTNEN, J. H.; BRISKE-ANDERSON, M. Deoxycholic acid and selenium metabolite methylselenol exert common and distinct effects on cell cycle, apoptosis, and MAP kinase pathway in HCT116 human colon cancer cells. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 85–92, 2010.
- ZHAO, H. C. et al. Synthesis and antitumor-evaluation of 1,3-selenazole-containing 1,3,4-thiadiazole derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6577–6579, 2013.
- ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, n. 10, p. 124–8, 2004.
- ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology Therapy**. v. 92, p. 57-70, 2001.
- ZHOU, J.; CHNG, W.-J. Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 4, p. 473–84, 2014.
- ZUCCO, F. et al. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 Years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 153–163, 2004.